



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA E AMBIENTALE

CICLO XXVI

COORDINATORE: Prof. Barbujani Guido

**Effetti dell'insetticida diofenolan su
Musca domestica Linnaeus, 1758**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/07

Dottorando

Dott. Pezzi Marco

Tutore

Prof. Leis Marilena

Anni 2011/2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 <i>Musca domestica</i>	pag. 1
1.1.1 Inquadramento sistematico	pag. 1
1.1.2. Adulti	pag. 1
1.1.3 Stadi immaturi	pag. 6
1.1.4 Ciclo biologico	pag. 8
1.1.5 Problemi sanitari legati a <i>M. domestica</i>	pag. 10
1.1.6 Nemici naturali di <i>M. domestica</i> in contesti zootecnici	pag. 11
1.2 Apparato riproduttore dei Diptera	pag. 12
1.2.1 Caratteristiche generali dell'ovario meroistico-politrofico	pag. 12
1.2.2 Anatomia macroscopica dell'apparato riproduttore femminile di <i>M. domestica</i>	pag. 13
1.2.3 Sviluppo del follicolo in <i>M. domestica</i>	pag. 15
1.2.4 Tipologie di cellule dell'ovario	pag. 16
1.3 Sistema endocrino negli insetti	pag. 24
1.3.1 Anello di Weismann	pag. 26
1.4 Principali neurormoni e ormoni degli insetti coinvolti nella riproduzione	pag. 28
1.4.1 Neurormoni ovarici	pag. 28
1.4.2 Ormoni giovanili (JH)	pag. 28
1.4.3 Ecdisteroidi	pag. 30
1.4.4 Ormone oostatico	pag. 31
1.4.5 Azione degli ormoni sullo sviluppo ovarico di <i>M. domestica</i>	pag. 33
1.5 Insetticidi	pag. 34
1.5.1 Classificazione degli insetticidi di sintesi	pag. 34
1.5.2 Insetticidi regolatori della crescita (IGR)	pag. 35
1.5.3 Il fenomeno della resistenza	pag. 37
1.5.4 Controllo di <i>M. domestica</i>	pag. 37
1.5.5 Diofenolan	pag. 39
2. SCOPO	pag. 41
3. MATERIALI E METODI	pag. 43
3.1 Ceppo utilizzato	pag. 43
3.2 Allevamento del ceppo	pag. 43
3.3 Principio attivo utilizzato nei biosaggi	pag. 43
3.4 Valutazione della tossicità al diofenolan negli stadi immaturi	pag. 44
3.5 Analisi morfologica delle larve e dei pupari	pag. 45
3.6 Indagini sull'apparato riproduttore femminile	pag. 47
3.6.1 Test di fecondità	pag. 47
3.6.2 Osservazioni allo stereomicroscopio	pag. 49

3.6.3 Test di fecondità e di schiusa per ciclo gonotrofico	pag.50
3.6.4 Analisi degli ovaroli tramite microscopia ottica a fresco	pag.53
3.6.5 Mappatura degli ovari	pag.53
3.6.6 Conteggio degli ovaroli	pag.54
3.6.7 Analisi morfologica ed ultrastrutturale degli ovaroli	pag.55
3.7 Saggio immunoenzimatico (EIA)	pag.57
3.7.1 Preparazione dei campioni per EIA	pag.57
3.7.2 Estrazione degli ecdisteroidi	pag.57
3.7.3 EIA	pag.58
3.8 Analisi morfologica ed ultrastrutturale dei corpora allata	pag.61
3.8.1 Analisi volumetrica e conteggio cellulare dei corpora allata	pag.63
3.9 Analisi ultrastrutturale delle uova deposte nei tre cicli gonotrofici	pag.63
4. RISULTATI	pag.64
4.1 Valutazione della tossicità del diofenolan sugli stadi immaturi	pag.64
4.2 Analisi morfologica delle larve e dei pupari	pag.65
4.2.1 Analisi morfologica ed ultrastrutturale dei pupari	pag.65
4.2.4 Analisi morfologica ed ultrastrutturale delle larve	pag.66
4.2.5 Analisi morfologica degli adulti imprigionati nel pupario	pag.67
4.3 Test di fecondità	pag.74
4.4 Analisi macroscopica	pag.75
4.5 Effetti del diofenolan sulla morfologia degli ovari	pag.77
4.5.1 Morfologia generale dell'ovario	pag.77
4.5.2 Ovaroli	pag.77
4.5.3 Mappatura di ovari in femmine trattate	pag.114
4.5.4 Conteggio degli ovaroli	pag.117
4.5.5 Percorsi di trasformazione degli ovaroli	pag.118
4.6 Test di fecondità e schiusa per ciclo gonotrofico	pag.124
4.7 Ultrastruttura delle uova deposte nei tre primi cicli gonotrofici	pag.127
4.8 Contenuto di ecdisterodi nelle femmine	pag.131
4.9 Corpora allata	pag.133
4.9.1 Morfologia ed ultrastruttura dei corpora allata	pag.133
4.9.2 Analisi volumetrica e conteggio cellulare dei corpora allata	pag.143
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.145
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E SITOGRAFICI	pag.153

1. INTRODUZIONE

1.1 *Musca domestica*

La mosca comune, *Musca domestica* Linnaeus, 1758, è ritenuto l'insetto domestico più diffuso al mondo (Noorman, 2001), in grado di riprodursi in ambiente naturale in ogni luogo, eccetto nelle aree subpolari, dove può giungere per trasporto passivo (Tremblay, 1997). L'inquadramento sistematico della mosca è riportato di seguito.

1.1.1 Inquadramento sistematico

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Tracheata

Classe: Hexapoda

Ordine: Diptera

Famiglia: Muscidae

Genere: *Musca* Linnaeus, 1758

Specie: *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Stoch, 2003).

L'area di origine di questa specie non è certa, ma si ritiene sia l'Africa, dove si è adattata e dove tuttora rappresenta uno dei ditteri coprofagi delle praterie e delle savane. Dall'Africa forse è arrivata nel vicino Oriente al seguito delle popolazioni umane, in quanto esistono descrizioni di questo insetto in documenti mesopotamici risalenti al 3.000 a.C. Dal vicino Oriente la specie è poi arrivata in Grecia e successivamente in Britannia. La colonizzazione del continente americano è ritenuta dagli studiosi più recente e comunque antecedente a quella di altri animali di provenienza europea, come il passero comune ed il topolino domestico (Tremblay, 1997).

1.1.2 Adulti

Morfologia. I maschi misurano circa 6.5 mm, mentre le femmine hanno una lunghezza di 5-8 mm (Introna e Campobasso, 1998). Il capo presenta occhi grandi e ben distanziati nelle femmine, più ravvicinati nel maschio. Grazie all'apparato boccale lambente succhiante, *M. domestica* rientra nel gruppo dei muscidi lambitori (Pagani et al, 2010), cioè in quella categoria di mosche con apparato boccale caratterizzato da una proboscide mobile dotata, all'estremità apicale, di piccole sporgenze carnose dette labelli (Giangaspero, 1997). Il torace presenta una colorazione grigiasta con 4 strie dorsali ad andamento longitudinale. L'addome è bombato e arrotondato all'estremità (Introna e Campobasso, 1998), i fianchi hanno colorazione giallastra a livello della metà basale, mentre nella zona posteriore si osservano tessellature bruno-nerastre che si estendono e si restringono alla base dell'addome

(Giangaspero, 1997). Le ali sono trasparenti ed iridescenti (Introna e Campobasso, 1998) con la nervatura M1 fortemente piegata in avanti (Moon, 2009), le zampe sono sottili ma robuste, con una colorazione nera ed una fitta serie di setole (Tremblay, 1997; Introna e Campobasso, 1998) (Fig. 1.1A).

Habitat e capacità di dispersione. *M. domestica* è una classica specie eusinantropica, cioè strettamente legata alle popolazioni umane e ai loro animali domestici e selvatici; è inoltre “pendolare”, polifaga e con spiccate abitudini endofile (Giangaspero, 1997; Tremblay, 1997). È molto diffusa negli allevamenti di bestiame (Birkemoe e Sverdrup-Thygeson, 2011) e rappresenta il principale infestante delle aziende avicole (Axtell, 1986). Insieme ai Calliphoridae e ai Sarcophagidae, *M. domestica* è inoltre il dittero più abbondante nelle discariche di rifiuti (Howard, 2001).

La distanza di dispersione potenziale di *M. domestica* varia a seconda dell’ambiente in cui si trova: da un range di circa 30-1.100 m in contesti urbani a 300-1.500 m in contesti rurali (Robinson, 2005). Alcuni studi hanno però dimostrato che questo dittero può eccezionalmente percorrere distanze comprese tra 10 e 30 km (Murvosh e Thaggard 1966; Robinson, 2005; Pampiglione e Romi, 2012).

L’elevata mobilità dell’adulto, insieme all’alto tasso di riproduttività, consente all’animale di adattarsi e sfruttare al meglio habitat instabili come i cumuli di rifiuti, che rappresentano temporanei siti di alimentazione (Imai, 1984). Questa estrema capacità di spostamento determina non solo problemi di infestazioni nei contesti zootecnici o nelle discariche, ma anche nelle zone residenziali limitrofe, con conseguenti rimostranze, fino a procedimenti giudiziari nei confronti di proprietari e gestori degli impianti accusati di generare l’infestazione (Axtell, 1986; Gerry et al., 2011; Pampiglione e Romi, 2012).

Occorre inoltre ricordare che l’insetto si dirige (e tende a permanere) in quelle aree dove sono presenti materiali organici di vario genere, costituiti non solo da alimenti ma anche da sostanze in decadimento. L’analisi di questo comportamento, effettuata da Lysyk e Axtell (1986a; 1986b) tramite marcatura e rilascio controllato di esemplari in allevamenti, ha evidenziato come dopo cinque giorni dal rilascio circa il 73% delle mosche si trovasse ancora a livello del punto di rilascio, l’8% si fosse spostato all’interno del perimetro dell’allevamento, mentre il 19% si fosse completamente allontanato da esso. Questo dimostra un comportamento relativamente sedentario, correlabile alla disponibilità trofica.

Alimentazione. *M. domestica* è una mosca lambitrice, estremamente poco selettiva nella scelta del cibo, potendosi nutrire di una vastissima gamma di materiale organico, dagli alimenti per uso umano ed animale agli escrementi di varia natura, alle secrezioni corporee, ai cadaveri ed ai rifiuti organici di varia tipologia (Thomas e Jespersen, 1994; Giangaspero,

2003; Robinson, 2005). Questi alimenti corrispondono in larga misura anche a quelli di cui si nutre lo stadio larvale.

L'estrema adattabilità di *M. domestica* ai differenti substrati alimentari è legata allo scarso sviluppo del senso dell'olfatto ed all'utilizzo, come fattori di riconoscimento dell'alimento, di calore, umidità ed emissione di CO₂. Tutti questi fattori sono percepiti a livello dei recettori antennali che, presenti in numero ridotto rispetto agli altri muscidi, determinano una minore selettività nella ricerca dell'alimento e quindi uno spiccato comportamento polifago (Giangaspero, 2003).

Attività. In condizioni naturali l'attività di *M. domestica* è influenzata da diversi fattori fisici, tra i quali la temperatura, l'umidità, l'intensità luminosit , le correnti e la pressione atmosferica (Thomas e Jespersen, 1994). L'attività degli adulti è pressoch  diurna e raggiunge un picco tra le ore 14:00 e le ore 16:00, interrompendosi totalmente durante la notte a meno che non sia presente una luce artificiale (Robinson, 2005). Nelle regioni temperate *M. domestica*   diffusa dall'inizio della primavera alla fine dell'estate (Giangaspero, 1997);   in grado di muoversi a temperature superiori a 4 C, sopra 7-12 C acquista la capacit  di volare ed esercita la massima attivit  tra 32 e 34 C. Il range di sopravvivenza   compreso tra -10 C e 50 C, ma in prossimit  di questi due estremi di temperatura la sopravvivenza si riduce a 3 ore (Thomas e Jespersen, 1994). A temperature persistenti inferiori a 0 C l'animale non   comunque in grado di sopravvivere e al di sopra di 44-47 C diventa del tutto inattivo (Thomas e Jespersen, 1994; Tremblay, 1997; Robinson, 2005).

Lo svernamento pu  verificarsi allo stadio larvale, allo stadio pupale o allo stadio adulto. Lo stadio larvale pu  continuare a vivere all'esterno anche nei mesi pi  freddi, se sono presenti cumuli di materiale organico in decomposizione (letame o rifiuti) mentre l'adulto, sfruttando le sue abitudini endofile, tenta di svernare in luoghi protetti, come case, stalle e altri ambienti riscaldati, sopravvivendo per l'intera stagione fredda (da ottobre ad aprile alle medie latitudini). A causa dell'elevato potenziale riproduttivo della specie, anche da pochi adulti in grado di svernare potr  derivare in primavera una numerosa popolazione in grado di riprodursi durante i mesi caldi (Tremblay, 1997; Robinson, 2005).

Longevit . In media gli adulti di *M. domestica* appartenenti ad una popolazione di campo hanno un'aspettativa di vita inferiore rispetto quella di adulti allevati in condizioni di laboratorio. Per stabilire l'et    quindi necessario impiegare metodi che si basano sullo sviluppo gonotrofico dell'animale (Suenaga, 1969) o su tecniche di marcatura e successiva ricattura (Lysyk, 1991). I valori di longevit  riportati in letteratura sono molto variabili: si va da 3-7 giorni indicati da Kristiansen e Skovmand (1985), a 15-25 giorni indicati da Murvosh e Thaggard (1966), fino a 30-60 giorni indicati da Robinson (2005). Questi valori cos 

eterogenei indicano come la longevità sia correlabile a diversi fattori ambientali. A questo riguardo sono stati condotti studi che mettono in relazione la longevità con l'alimentazione, la temperatura ed il sesso. Questi studi hanno dimostrato come la longevità, sia nelle femmine sia nei maschi, decresca con l'aumento della temperatura e in modo più marcato nei maschi. La vita delle femmine adulte dura circa 44 giorni a 20°C e scende a circa 11 giorni a 35 °C, mentre nei maschi dura circa 33 giorni a 20°C e scende a circa 12 giorni a 35°C. Anche la tipologia dell'alimento è di fondamentale importanza: il saccarosio risulta il fattore più importante nei confronti dell'aumento di aspettativa di vita. Alimentando infatti le mosche con solo letame la longevità si aggira sui 3 giorni, mentre se le mosche sono alimentate con una miscela di letame e saccarosio la longevità aumenta fino a circa 19 giorni (Fletcher et al., 1990; Lysyk, 1991).

Accoppiamento. In condizioni prossime a quelle ideali, cioè tra 27 e 30°C e ad un'umidità relativa elevata (70-90%), il maschio è pronto per la copula dopo 10-12 ore dallo sfarfallamento e la femmina dopo 24-48 ore. In condizioni non favorevoli può essere necessaria anche più di una settimana. Rogoff e collaboratori (1964) hanno dimostrato per primi che le femmine di *M. domestica* sono in grado di produrre una sostanza o una miscela volatile con attività feromonica sessuale, determinando l'attrazione del maschio verso la femmina ed il successivo corteggiamento. In seguito sono state condotte indagini che hanno documentato la presenza di una miscela di feromoni sessuali (molecole idrocarburiche e non), tra i quali il più abbondante ed importante è lo Z-9-tricosene (o muscalure) (Singer, 1998; Montooth e Gibbs, 2003). Questi feromoni sessuali iniziano ad essere sintetizzati dopo 2 giorni dallo sfarfallamento a livello del tegumento addominale e, in misura minore, sulle zampe; una parte dei feromoni prodotti dal tegumento addominale è inoltre trasferita alle zampe durante le operazioni di "grooming" (Dillwith e Blomquist, 1982; Blomquist et al., 1984). La produzione di queste molecole è fortemente legata al grado di sviluppo dell'ovario e, per questo motivo, la loro sintesi avviene solo se la femmina è in vitellogenesi (Dillwith et al., 1983). Inoltre, come è stato accertato in *Drosophila melanogaster* la regolazione della sintesi dello Z-9-tricosene è sotto il controllo degli ecdisteroidi (Wicker e Jallon, 1995; Wicker-Thomas, 2007). Un interessante studio condotto da Adams e Holt (1987) ha dimostrato che i maschi di *M. domestica* trattati esclusivamente con Z-9-tricosene mostrano un aumento nel comportamento omosessuale, mentre se sono trattati con una miscela di Z-9-tricosene e con la frazione non idrocarburica dei feromoni sessuali tipici della specie il fenomeno non si verifica. Gli stessi studiosi hanno quindi identificato nella frazione non idrocarburica i fattori di riconoscimento sessuale. Oltre ai feromoni sessuali prodotti dalla femmina Schlein e

collaboratori (1981) hanno identificato un ulteriore feromone, l'abstinone, prodotto dal maschio con la funzione di evitare il corteggiamento omosessuale.

L'accoppiamento avviene con la presa di iniziativa del maschio, che tenta di montare la femmina facendo vibrare energicamente le ali. Questa operazione, denominata "wing fanning", servirebbe a favorire la diffusione di un ipotetico afrodisiaco maschile (Tremblay, 1997). La copula inizia soltanto con il consenso della femmina che, se recettiva, estroflette l'ovopositore, inserendolo nell'atrio genitale maschile: il maschio effettua quindi l'inseminazione, riempiendo le spermateche femminili in un tempo non inferiore a un'ora (Shin et al., 2003). Durante l'accoppiamento i due sessi restano fortemente uniti e, se disturbati, non interrompono la copula, riuscendo la femmina a volare con il compagno sul dorso. Dopo la copula la femmina avrà un comportamento monogamo e rifiuterà i successivi accoppiamenti, lacerando a colpi di tibia delle zampe medie le ali dei pretendenti: questi non saranno più in grado di volare a causa delle ali completamente rovinate a seguito di tentativi ripetuti di copula (Tremblay, 1997). Il comportamento monogamo della femmina sembra determinato da una sostanza contenuta nel liquido seminale e prodotta a livello del dotto eiaculatore maschile (Riemann et al., 1967; Riemann e Thorson 1969), in modo simile a quanto osservato in *Aedes aegypti*, in cui la femmina rifiuta le successive inseminazioni a causa del "matrone", molecola di origine proteica prodotta dalle ghiandole accessorie dell'apparato riproduttore maschile e trasferita durante l'unico accoppiamento della femmina (Fuchs et al., 1969; Hiss e Fuchs, 1972). Il maschio è invece poligamo e riesce ad accoppiarsi 5-6 volte nelle 24 ore (Tremblay, 1997). Shin e collaboratori (2003) hanno dimostrato che i maschi si accoppiano con femmine vergini a circa 7 giorni dallo sfarfallamento.

Ovoposizione. La femmina, ricevuta la carica spermatica e acquisite le necessarie proteine alimentari, va incontro a più cicli ovarici (Tremblay, 1997), di solito tre o quattro, deponendo ogni 2-4 giorni un numero di uova variabile tra 100 e 250, e raggiungendo a volte una produzione totale di circa mille uova (Rozendaal, 1997; Tremblay, 1997; Noorman, 2001; Moon, 2009). Le uova sono deposte a gruppi di centinaia se più femmine convergono in uno stesso punto su un idoneo materiale: ciascuna femmina estroflette l'ovopositore fino a raggiungere, con opportuni movimenti del corpo, la profondità di 8-10 mm. L'ovoposizione cessa al di sotto dei 15°C (Tremblay, 1997). Le femmine possono ovideporre su qualsiasi sostanza che possa assicurare nutrimento alla futura prole (Süss e Locatelli, 2001). Sono stati elencati oltre 40 potenziali pabula su cui la femmina potrebbe ovideporre. I fattori che inducono ad effettuare l'ovoposizione in un determinato sito sono il calore emesso dalla massa ed i gas fermentanti (Tremblay, 1997). La scelta del sito di deposizione è inoltre condizionata da feromoni di aggregazione: Jiang e collaboratori (2002) hanno infatti

dimostrato che le femmine sono indotte a deporre tutte in uno stesso luogo dalla produzione e successiva liberazione nell'aria di due feromoni, il tricosane e lo Z-9 tricosene. Queste due molecole sembrano avere un effetto dose-dipendente sull'aggregazione delle femmine gravidе, anche se dosi troppo elevate determinano una perdita nella loro capacità attrattiva.

1.1.3 Stadi immaturi

Uova. Le uova sono di colore bianco opaco-crema (Pampiglione e Romi, 2012), con lunghezza intorno a 1.2 mm ed altezza intorno a 0.3 mm (Sukontason et al., 2004) e forma ovale allungata, leggermente concava dorsalmente e convessa ventralmente (Skidmore, 1985) (Fig. 1.1B). Dorsalmente sono presenti due solchi longitudinali paralleli, definiti linee di schiusa, che tendono a divergere all'estremità posteriore per poi ricongiungersi nell'estremità anteriore. Uno studio ultrastrutturale non recente (Hinton, 1960) ha rivelato che il corion è costituito da tre strati, uno interno, uno medio e uno esterno. Lo strato interno e quello esterno sono entrambi reticolati e nel primo sono presenti numerosi e piccoli aeropili. Al contrario, nello strato medio vi sono pochi e ampi aeropili e questo strato provvede in larga misura a fornire resistenza meccanica all'uovo.

Gli aeropili all'interno dello strato mediano sono in continuità con lo strato interno e quello esterno, consentendo uno scambio dei gas. I due strati più esterni sono composti da materiale ad aspetto colonnare, disposto perpendicolarmente rispetto allo strato mediano. In molte specie di Muscidae, ma non in tutte, le colonne si presentano ramificate ai due apici e le ramificazioni sono perpendicolari rispetto all'asse. Le ramificazioni orizzontali dello strato esterno formano un fine reticolo idrorepellente che provvede a fornire un'ampia interfaccia acqua-aria quando le uova sono sommerse: questo sistema è adattato sia per la respirazione in atmosfera sia per la respirazione acquatica (Hinton, 1967). In aria l'ossigeno si diffonde attraverso il reticolo esterno, gli aeropili dello strato mediano e il reticolo dello strato interno. In acqua il reticolo dello strato più esterno provvede invece a creare un'ampia interfaccia per l'estrazione dell'ossigeno disciolto. Gli interstizi del reticolo dello strato più interno presentano un'ampiezza di circa 0.5 - 1 μm . È inoltre evidenziabile un'ornamentazione superficiale del corion, di forma esagonale, che riflette il profilo delle cellule follicolari deputate alla secrezione del corion stesso.

Al di fuori delle linee di schiusa, lo strato più esterno è costituito da colonne perpendicolari allo strato mediano, alte tra 1 e 2 μm . All'apice di queste colonne si diparte un intreccio finemente perforato che costituisce la parte esterna del corion. Lo strato mediano mostra aeropili con ampiezza tra 0.7 e 1.5 μm (Hinton, 1967) e tra le due linee di schiusa è presente un vero e proprio sistema respiratorio, detto piastrone. Questa struttura, molto simile nelle varie specie di Muscidae e Calliphoridae, è costituita da uno strato colonnare perpendicolare

allo strato mediano, che nella zona apicale assume un aspetto claviforme. Da queste estremità si dipartono orizzontalmente alcune ramificazioni che portano alla formazione di una fitta rete idrorepellente (Hinton, 1963; 1969). Nell'estremità posteriore delle uova di *M. domestica* sono presenti uno o due aeropili polari, con diametro 7.5 - 8.0 μm , che favoriscono gli scambi respiratori tra l'atmosfera e l'ooplasma polare: infatti in molti ditteri, comprese le specie appartenenti al genere *Musca*, il citoplasma a livello del polo posteriore dell'uovo è coinvolto nei primi stadi dell'embriogenesi per la formazione delle cellule germinali, e necessita quindi di una grande disponibilità di ossigeno. L'aspetto di ciascun aeropilo è caratterizzato da creste e da una bordatura sopraelevata, dovuta all'intersezione di 6-8 cellule follicolari disposte radialmente attorno all'aeropilo stesso. Nel polo anteriore la regione micropilare ha un aspetto imbutoforme ed un diametro complessivo di circa 12 μm . Il diametro dell'apertura del canale micropilare è circa 1.5 μm . L'area che circonda la regione micropilare ha un aspetto spongiforme e con aperture disposte in maniera irregolare (di diametro 1 - 2.5 μm) che probabilmente fungono da aeropili esterni (Cummings et al., 1974).

Larva. *M. domestica* presenta 3 stadi larvali apodi, a tipologia criptocefala (Grandi, 1966) (Fig. 1.1C, inserti). Il corpo della larva ha forma affusolata, con capo estremamente ridotto in cui si può individuare il caratteristico apparato boccale cefalo-faringeo, munito di uncini boccali e di un paio di antenne papilliformi (Moon, 2009), e la totale assenza di occhi. Nel protorace è possibile individuare un paio di spiracoli digitiformi, costituiti ciascuno da circa 5 lobi. Alla base di ciascun segmento addominale è presente un paio di pseudopodi e l'ultimo segmento presenta un paio di piastre respiratorie reniformi e l'apertura anale (Crosskey, 1993). Il primo stadio larvale ha una lunghezza di circa 2.5 - 3 mm, una colorazione biancastra o quasi trasparente e presenta le piastre respiratorie nell'ultimo segmento addominale. Il secondo stadio larvale ha una lunghezza di circa 6-7 mm, una colorazione biancastra e, oltre alle due piastre respiratorie addominali, nel torace compaiono i due spiracoli digitiformi. Il terzo stadio ha una lunghezza di circa 12-14 mm ed una colorazione biancastra all'inizio e giallastra al termine del suo sviluppo (Skidmore, 1985; Introna e Campobasso, 1998).

Pupa e pupario. La pupa di *M. domestica*, e dei Muscidae in generale, è un tipico esempio di pupa coarctata (Siriwattanarungsee et al., 2005) che rimane all'interno della cuticola del terzo stadio larvale, che va incontro ad una contrazione e ad un indurimento (Moon, 2009) (Fig. 1.1D). Il processo di trasformazione in pupa è un fenomeno che comprende due fasi ben distinte: la prima è detta "pupariazione" ("pupariation"), cioè formazione del pupario, e consiste, come precedentemente menzionato, in un fenomeno di contrazione, sclerotizzazione e pigmentazione della cuticola dell'ultimo stadio larvale; la seconda fase, detta "pupazione"

(“pupation”) (Giangaspero, 1997), rappresenta la vera e propria fase pupale, nella quale compare la pupa grazie alla formazione del tegumento pupale e dello spazio tra la pupa e il pupario (Moon, 2009). In seguito al processo di contrazione, sclerotizzazione e indurimento il pupario assume una forma a barilotto, un aspetto rigido, una colorazione bruno-rossastra (Skidmore, 1985; Giangaspero, 1997) ed una lunghezza tra 5 e 6 mm. Il pupario di *M. domestica* mostra ornamentazioni in gran parte derivanti da quelle presenti sulla cuticola del terzo stadio larvale e striature trasversali che ne riflettono la metameria. Il segmento cefalico è retratto, come pure la zona anteriore del protorace, dove sono presenti due gruppi di circa sei spiracoli papilliformi, disposti in due linee laterali al protorace. Sul bordo posteriore del primo segmento addominale sono inoltre presenti due spiracoli a forma di corno, ciascuno dei quali è dotato all’apice di numerose papille. Nel segmento caudale sono presenti due spiracoli, ciascuno dei quali è delimitato da un peritrema leggermente sollevato rispetto alla superficie dell’intero pupario. Il peritrema è a forma di D: al suo interno si possono individuare tre fessure digitiformi lungo il bordo curvo, uno spiracolo sinuoso che decorre lungo il bordo curvo e un spiracolo a forma di bottone aderente al bordo rettilineo del peritrema (Siriwattananurungsee et al., 2005).

1.1.4 Ciclo biologico

Il ciclo biologico di *M. domestica*, come quello di altri ditteri brachiceri, è costituito da quattro fasi: uova, tre stadi larvali, pupa ed adulto (Fig. 1.1A-D) (Giangaspero, 1997). Gli adulti fuoriescono dal pupario durante le ore diurne e sono sessualmente immaturi, ma è sufficiente un arco di tempo di due giorni perché maschi e femmine si possano riconoscere ed accoppiare, e le femmine possano ovideporre. A temperatura e umidità ottimali (30-32°C e 70-80% UR) lo sviluppo embrionale è molto rapido (8-12 ore) ma può allungarsi fino a 2-3 giorni a temperatura tra 15 e 16°C, e si interrompe al di sotto di 11°C e al di sopra di 42°C.

Lo sviluppo post-embrionale dura circa 8 giorni, così distribuiti nei vari stadi: 20 ore nel primo stadio larvale, 24 ore nel secondo, 72 ore nel terzo ed altre 72 ore in quello di pupa (Tremblay, 1997); può essere fortemente influenzato da numerosi fattori che possono determinare accelerazione, rallentamento o addirittura arresto. Sono stati condotti vari studi sulla sopravvivenza e sullo sviluppo larvale in funzione di temperatura, umidità, composizione del pabulum e densità larvale. Questi studi hanno evidenziato come le larve possano essere:

- estremamente adattabili nel concludere lo sviluppo in un’ampia gamma di pabula, che vanno dal tessuto animale alle deiezioni di varia natura (Schmidtman, 1991; Hogsette, 1996; Arong et al., 2011);

- atte a svilupparsi in materiali organici non gestiti, come dimostrato dalle ricerche di Lysyk (1993) che hanno evidenziato come abbondanti cumuli di letame rappresentino un ottimo ambiente per lo sviluppo larvale;
- fortemente condizionabili da temperatura e umidità; valori tra 25°C e 30°C, con elevata umidità, consentono di determinare un sviluppo larvale completo tra 7 e 12 giorni (Bernard e Geden, 1993; Giangaspero, 1997), mentre cumuli di letame asciutti alla stessa temperatura accolgono poche larve (Alahmed, 1998) e ne rallentano lo sviluppo.

Quando le trasformazioni all'interno del pupario sono completate, sul quarto segmento della pupa compare una fessurazione: il giovane adulto forza la calotta del pupario tramite un'azione pressoria esercitata dallo ptilino, sacco rigonfio di emolinfa che protrude dalla regione frontale del capo, tra gli occhi e la base delle antenne. Una volta fuoriuscito il capo, tutto l'insetto esce, liberandosi della membrana pupale che rimane attaccata al pupario. In alcuni casi il giovane adulto non ancora in grado di volare si fa strada tra detriti, terra e foglie aiutandosi con lo ptilino. Contemporaneamente avviene la distensione delle ali e l'indurimento dell'esoscheletro: la mosca assume la sua colorazione definitiva. Dopo poco tempo lo ptilino, esaurite le sue funzioni, si restringe sgonfiandosi, e scompare (Giangaspero, 1997). La descrizione dello stadio adulto è stata trattata nel paragrafo 1.1.2.

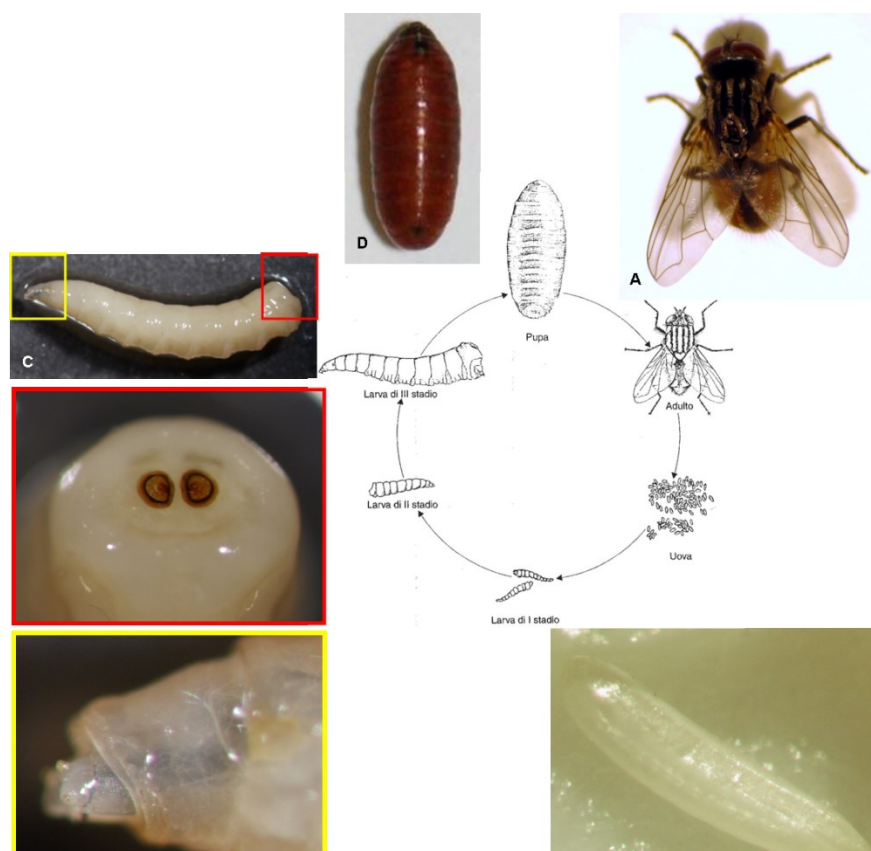


Fig. 1.1. Ciclo biologico di *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera Muscidae) (Da Giangaspero, 1997). [A]. Adulto. [B] Uovo. [C] Larva. Gli inserti mostrano la regione posteriore (in alto) e la regione anteriore (in basso). [D] Pupario.

1.1.5 Problemi sanitari legati a *M. domestica*

Per la sua estrema ubiquità e sinantropia *M. domestica* è in grado di rivestire un ruolo patogeno sia allo stadio larvale sia allo stadio adulto (Moon, 2009). La larva di *M. domestica* è considerata “miasi facoltativa” in quanto la larva normalmente conduce vita libera e solo occasionalmente può diventare parassita (Dogra e Mahajan, 2010), tramite diretta ovideposizione su ferite (Moon, 2009) oppure tramite ingestione accidentale di uova o larve (Shekhawat et al., 1993).

La larva può determinare:

- miasi cutanee e sub cutanee; è stato segnalato un caso di ritrovamento di larve in ulcere cutanee a livello delle gambe (Burgess e Davies, 1991) e sono documentati casi di infestazione al di sotto del cuoio capelluto (Ferraz et al., 2010);
- miasi degli orifizi esterni; in particolare sono stati segnalati casi di miasi orali in bambini (Dogra e Mahajan, 2010; Chaudhry et al., 2011; Ucan et al., 2011);
- miasi degli organi interni; sono stati segnalati casi di miasi intestinali (Sehgal et al., 2002; Shekhawat et al., 1993) e urogenitali (Crosskey, 1993).

Lo stadio adulto rappresenta invece una seria minaccia per la salute umana ed animale, poiché si tratta di un vettore meccanico di una ampia gamma di patogeni (Thaddeus et al., 2001). L'adulto di *M. domestica* è estremamente pericoloso a causa della sua ampia mobilità e delle sue abitudini, che lo portano ad entrare in contatto con materiale in decadimento (feci, rifiuti, vomito) e con l'uomo e/o gli animali, in modo diretto oppure indirettamente tramite gli alimenti, acquisendo la capacità di trasmettere organismi patogeni (De Jesús et al., 2004; Fallatah et al., 2007; Nwangwu et al., 2013). Sono stati descritti tre meccanismi di trasmissione con i quali *M. domestica* può espletare la sua azione patogena.

1. Trasporto di parassiti sulla superficie del corpo. Questo meccanismo è legato alla presenza sul corpo di *M. domestica* di spine, setole e ornamentazioni che hanno la capacità di intrappolare e veicolare microrganismi.
2. Rigurgito sul cibo. Questo meccanismo è determinato dall'attività di rigurgito effettuata regolarmente da questo insetto durante le operazioni di assunzione del cibo. Infatti *M. domestica*, possedendo un apparato boccale succhiatore-lambente non perforante, non ha la capacità di ingerire materiale solido; di conseguenza è costretta a sciogliere l'alimento e per eseguire questa procedura deve rigurgitare saliva e cibo precedentemente ingerito. Nel caso in cui la mosca sia infetta si instaurerà una reazione infettiva sul pabulum di cui si sta nutrendo.
3. Ingestione e successiva defecazione di patogeni. Questo meccanismo di trasmissione è da considerarsi il più efficace, in quanto il patogeno può sfruttare l'intestino dell'insetto per

proteggersi, riprodursi e successivamente diffondersi con le feci (Crosskey, 1993; Graczyk et al., 2001; Sukontason et al., 2006; Förster et al., 2007).

La gamma di patogeni che *M. domestica* può trasportare è molto ampia:

- virus: rotavirus, virus di Aujeszky (herpesvirus della pseudorabbia dei suini), poliovirus, virus dell'epatite (Medveczky et al., 1988; Crosskey, 1993; Tan et al., 1997);
- batteri: *Chlamydia trachomatis*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.* e *Aeromonas caviae* (Wolff e van Zijl, 1969; Levine e Levine, 1991; Grübel et al., 1997; Zurek et al., 2000; Fotadar, 2001; Nayduch et al., 2001; Mian et al., 2002; De Jesús et al., 2004; Nazni et al., 2005; Holt et al., 2007; Sukontason et al., 2007; Förster et al., 2009b);
- oocisti e cisti di protozoi: *Cryptosporidium sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia* (Graczyk et al., 1999; Doiz et al., 2000; Cladel et al., 2002; Graczyk et al., 2005; Okore Oghale et al., 2013);
- elminti: *Habronema muscae*, *Thelazia gulosa*, *Thelazia rhodesii*, *Thelazia skrjabini*, *Ascaris suum* e *Trichuris suis* (Otranto et al., 2003; Förster et al., 2009a; Schuster et al., 2010)
- artropodi parassiti: principalmente neanidi di pidocchi, ma alcuni autori hanno individuato sul corpo di *M. domestica* anche ninfe di *Haematopinus suis* (Tremblay, 1997; Förster et al. 2009a);
- funghi patogeni: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Microsporum canis* (Cafarchia et al., 2009; Förster et al., 2009b).

1.1.6 Nemici naturali di *M. domestica* in contesti zootecnici

In contesti zootecnici *M. domestica* può essere controllata grazie alla presenza di nemici naturali che svolgono un'attività di predazione e di parassitismo (parassitoidi) su uova, larve e pupe. Tra i predatori troviamo:

- coleotteri come *Dermestes ater* (Menezes et al., 2006), *Carcinops pumilio* (Achiano e Giliomee, 2005) e *Creophilus maxillosus* (Greene, 1996);
- ditteri come *Ophyra aenescens* (Nolan e Kissam, 1985; Farkas e Jantnyik, 1990; Turner e Carter, 1990), in questo caso utile ma che può rappresentare un problema perché è in grado di causare miasi intestinali nei suini (Calzolari et al., 2008);
- acari della famiglia Macrochelidae, come *Macrocheles muscaedomesticae* (Coons e Axtell, 1973).

Tra i parassitoidi troviamo insetti appartenenti all'ordine Hymenoptera e alla famiglia Pteromalidae, tra cui *Spalangina sp.*, *Muscidifurax sp.*, *Dirhinus texanus*, *Pachycrepoideus vindemia* e *Nasonia vitripennis* (Rueda e Axtell, 1985a; Rueda e Axtell, 1985b; Greene et al., 1998).

1.2 Apparato riproduttore dei Diptera

1.2.1 Caratteristiche generali dell'ovario meroistico-politrofico

Tutti i Diptera presentano un paio di ovari con organizzazione meroistico-politrofica (Kubrakiewicz et al., 1998) (Fig.1.2A-G). Questo tipo di organizzazione, considerato il più evoluto tra gli insetti, è caratterizzato dalla presenza di un ovario costituito da elementi discreti, definiti ovaroli, in cui il vitello è prodotto da cellule specializzate, dette cellule nutrici (cellule vitellogene o trofociti), localizzate in stretta associazione con ogni oocita (Tremblay, 1982). All'interno di ciascun ovario si possono identificare tre regioni specifiche, un filamento terminale, un germario ed un vitellario (Ansari e Murad, 1981; Giorgi et al., 1990; Jaglarz et al., 2008; Adham et al., 2009) (Fig.1.2F, G), le cui caratteristiche principali sono le seguenti:

- il filamento terminale è in grado di legare gli ovaroli al diaframma dorsale attraverso un legamento sospensorio;
- il germario contiene le cellule germinali “primordiali” (oogoni) che si differenzieranno in oociti e cellule nutrici (trofociti);
- il vitellario occupa la maggior parte dell'ovarolo e contiene i follicoli (“egg chamber”), definiti anche come unità funzionali e strutturali dell'intero ovario. Il termine “vitellario” si ricollega all'evento di fondamentale importanza che avviene durante l'oogenesi, cioè la vitellogenesi (King, 1970) (Fig.1.2F, G).

Tutti gli studi sui ditteri superiori descrivono i follicoli con una morfologia molto simile, che consiste di un involucro formato da un epitelio follicolare somatico derivato dal mesoderma e da 16 cellule della linea germinale: un oocita e 15 cellule nutrici poliploidi, generate da quattro consecutive e incomplete mitosi dei cistoblasti, a loro volta derivati dalla divisione degli oogoni (Jaglarz et al., 2008). I follicoli si formano nella parte anteriore dell'ovario ed avanzano verso il polo posteriore man mano che procede l'oogenesi. In questo modo ciascun ovario contiene una schiera di follicoli in ordine di sviluppo: i follicoli più giovani si trovano più vicini al germario, mentre quelli in fase più avanzata dell'oogenesi occupano la posizione posteriore dell'ovarolo (Velentzas et al., 2007). A seconda della specie, il vitellario può contenere contemporaneamente numerosi follicoli a vario grado di sviluppo: ad esempio, nelle specie appartenenti al genere *Drosophila* se ne possono riscontrare 6 o 7 (King, 1970), mentre in *Chysomya megacephala*, *Chysomya putoria*, *Lucilia cuprina*, *M. domestica*, *M. autumnalis* e *Cochliomya hominivorax* se ne ritrovano 2 (King et al., 1956; LaChance e Bruns, 1963; Goodman et al., 1968; Van Geem et al., 1983; Avancini e Do Prado, 1986; Chaiwong et al., 2012). Ogni follicolo è inoltre unito a quelli contigui tramite un particolare gruppo di cellule follicolari che formano un peduncolo interfollicolare (Goodman et al.,

1968). Il numero degli ovariooli costituenti un singolo ovario nei Cyclorrhapha può variare da uno fino a più di 100. I casi di ovari con un singolo ovario o con un numero relativamente basso di ovariooli sono ad esempio quelli di *Hippobosca maculata* (1) (Ansari e Murad, 1981), *Drosophila melanogaster* (16-20) (King et al., 1956) e *M. autumnalis* (15) (Valder, 1969), mentre i casi di ovari con un numero elevato di ovariooli sono quelli di *M. domestica* (50-75) (Goodman et al., 1968; Chia e Morrison, 1972; Sakurai, 1973; Adams, 1974; Trepte, 1979), *Chysomya putoria* (circa 80) (Avancini e Do Prado, 1986), *Lucilia cuprina* (circa 100) (Clift e McDonald, 1973) e *Cochliomyia hominivorax* (100-150) (LaChance e Bruns, 1963).

1.2.2 Anatomia macroscopica dell'apparato riproduttore femminile di *M. domestica*

Nella metà distale dell'addome delle femmine di *M. domestica* sono presenti due ovari globosi (Fig. 1.2A, D) circondati da una tunica propria contenente una fitta rete di trachee (Lineva, 1953) e costituiti ciascuno da 50-75 ovariooli (Goodman et al., 1968; Chia e Morrison, 1972, Sakurai, 1973; Adams, 1974), di solito disposti in 4-5 cerchi concentrici (Kleine-Schonnefeld e Engels, 1981). Ogni ovario è circondato da un sottile mesotelio muscolare. Il numero degli ovariooli dipende generalmente dalle condizioni di crescita della larva e in particolare dalla dieta (Goodman et al., 1968). In ciascun ovario si individua un vitellario, composto da 2-3 ordini di follicoli, con grado di maturazione crescente a mano a mano che ci si allontana dalla zona anteriore, ognuno dei quali si sviluppa in modo sincrono con follicoli adiacenti (Hall et al., 1976). Ciascun ovario si collega tramite un breve ovidotto a un unico dotto comune (Goodman et al., 1968), che a sua volta si curva dorsalmente e in avanti, dilatandosi a formare un sacco che continua con una vagina che si apre nell'ovopositore, immediatamente dietro la piastra subanale del XI segmento.

In corrispondenza del sacco e della vagina si trovano le seguenti appendici sacciformi:

1. un paio di vescicole copulatorie;
2. un paio di ghiandole accessorie allungate, con la funzione di secernere una sostanza adesiva che copre ciascun uovo e che consente l'adesione al substrato e/o ad altre uova;
3. tre spermateche, due sul lato sinistro e una sul lato destro, ciascuna delle quali è costituita da un sottile dotto che si continua in una capsula ovale chitinoso di colore nero (Giangaspero, 1997) (Fig. 1.2B-E).

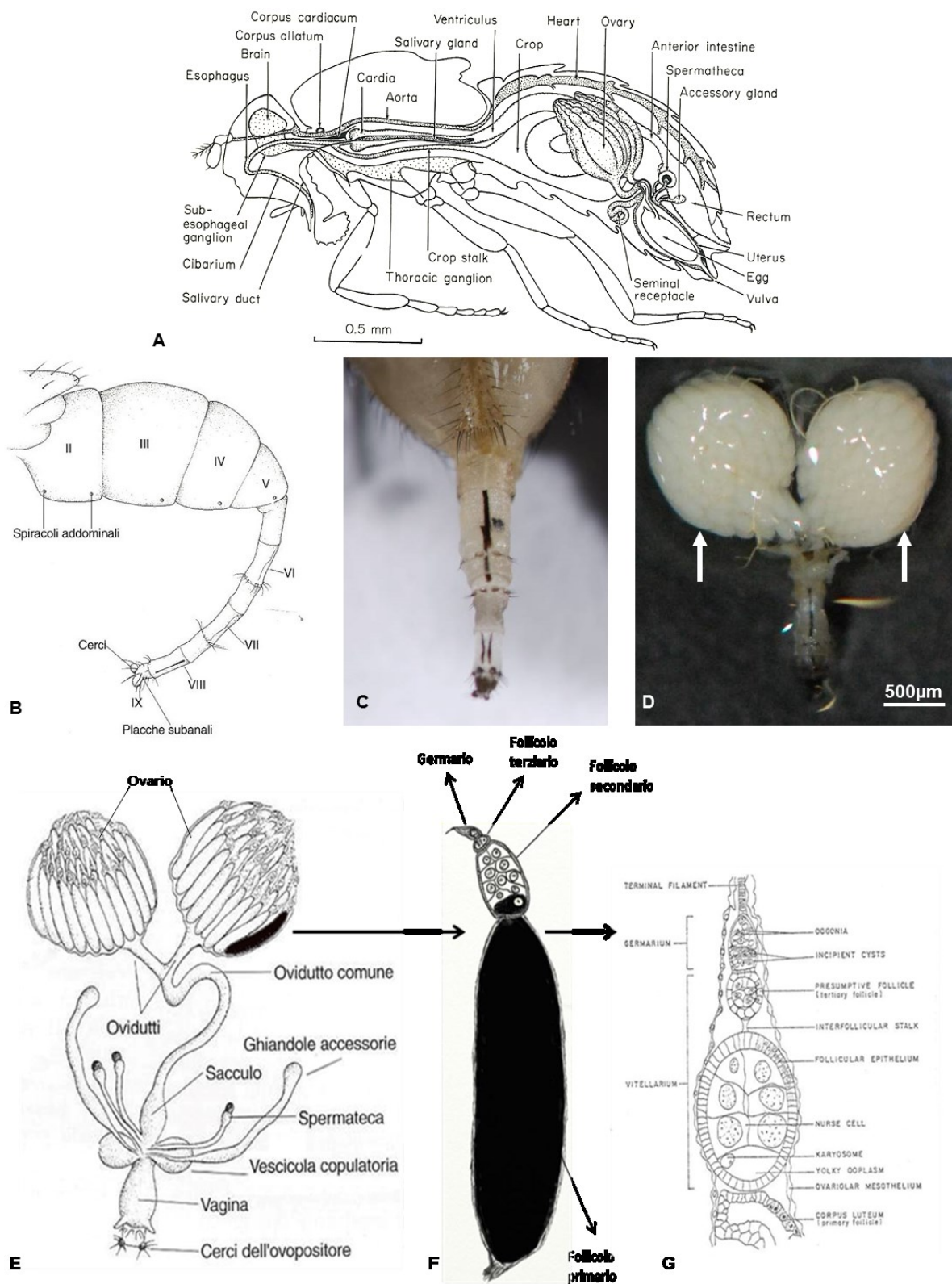


Fig. 1.2. Morfologia di *M. domestica*. [A] Anatomia interna (Da King, 1970). [B] Ovopositore di sostituzione estroflesso (Da Giangaspero, 1997). [C] Immagine dell'ovopositore estroflesso. [D] Immagine *in toto* dell'apparato riproduttore femminile. Le frecce indicano gli ovarii globosi. [E]. Schema dell'apparato riproduttore femminile (Da Giangaspero, 1997). [F] Ovariolo *in toto*. [G] Schema del germario e del follicolo secondario e terziario (Da Goodman et al., 1968).

1.2.3 Sviluppo del follicolo in *M. domestica*

Tra gli anni '50 e '70 sono state intraprese numerose ricerche per descrivere le varie fasi di sviluppo del follicolo di *M. domestica*. La maggior parte di questi è basata sul lavoro fondamentale di King e collaboratori (1956) che descriveva le fasi di sviluppo del follicolo in *Drosophila melanogaster*. Di seguito sarà presentata una sintesi dei dati raccolti in questi studi, prendendo come riferimento quello di Sakurai (1973) che, a differenza degli altri, divide lo sviluppo follicolare di *M. domestica* in sette fasi.

Fase 1. Corrisponde alla femmina appena sfarfallata in cui il germario è localizzato nella parte terminale anteriore dell'ovario e contiene i cistoblasti. La divisione dei cistociti prende avvio nel germario ed inizia a differenziarsi la cisti germinale. In questo stadio avviene il primo inizio di differenziamento del vitellario.

Fase 2. La femmina è sfarfallata da 12 ore e dal germario si separa la cisti germinale, che entra nel vitellario. A questo punto la cisti germinale può essere definita follicolo ("egg chamber"). Il follicolo ha però dimensioni ancora ridotte e forma sferica, ed è costituito da 15 cellule nutrici ed un oocita, che occupa circa il 6% dell'intero follicolo (Adams, 1974) e nel cui nucleo inizia a differenziarsi il cariosoma. Il follicolo è circondato da un epitelio le cui cellule sono in iniziale attività proliferativa.

Fase 3. La femmina è sfarfallata da 24 ore: il follicolo assume una forma ellissoidale ed il suo epitelio è ancora cuboidale (Sakurai, 1973). L'oocita è ipertrofico, occupa circa il 20% dell'intera camera follicolare (Adams, 1974) ed inizia ad accumulare vitello (Trepte, 1979); sono infatti evidenziabili granuli di tuorlo all'interno dell'ooplasma (Adams, 1974).

Fase 4. La femmina è sfarfallata da 48 ore: il follicolo inizia ad assumere una forma allungata, con l'oocita che inizia ad accrescersi considerevolmente. L'epitelio follicolare si differenzia in un sottile epitelio squamoso intorno alle cellule nutrici e in un epitelio colonnare intorno all'oocita. All'apice del follicolo un gruppo di cellule ("border cell cluster"), che comprende le cellule del bordo e le cellule polari, inizia e completa una migrazione attraverso le cellule nutrici, andandosi a posizionare centralmente in corrispondenza dell'interfaccia cellule nutrici-oocita. Alla fine di questa fase ha inizio la formazione della membrana vitellina (Sakurai, 1973; Adams, 1974).

Fase 5. La femmina è sfarfallata da 60 ore e si assiste al massimo sviluppo delle cellule nutrici, corrispondente al 60-70% dell'intero follicolo. Le cellule follicolari che stanno ai lati dell'interfaccia cellule nutrici-oocita iniziano ad estendersi verso l'interno del follicolo, generando un ponte di cellule che si unirà poi alle cellule del bordo (Adams, 1974).

Fase 6. La femmina è sfarfallata da 72 ore e l'oocita ha raggiunto le sue massime dimensioni, con la degenerazione delle cellule nutrici. Proteine, lipidi e glicogeno sono depositati abbondantemente nell'ooplasma, formando le sfere di tuorlo (Sakurai, 1973).

Fase 7. La femmina è sfarfallata da 96 ore, l'oocita occupa il 100% dell'intero follicolo (Adams, 1974), tutti gli strati dell'uovo sono stati completati (Goodman et al., 1968) e le sfere del vitello sono distribuite in maniera omogenea (Sakurai, 1973). Le cellule nutrici e le cellule follicolari sono completamente degenerate. Da questo momento l'uovo maturo può passare nell'ovidutto ed essere deposto; i residui delle cellule nutrici e delle cellule follicolari che non sono stati riassorbiti rimangono nell'ovario e vanno a costituire il corpo luteo (Goodman et al., 1968). In questa fase è già in atto la crescita dei follicoli secondari (Sakurai, 1973) (Fig. 1.3A).

1.2.4 Tipologie di cellule dell'ovariolo

Le varie tipologie di cellule che costituiscono l'ovariolo dei Cyclorrhapha sono state ampiamente descritte in *Drosophila melanogaster*, mentre per tutti gli altri ditteri non è disponibile una simile quantità di informazioni. Solo per poche specie esistono infatti informazioni comprensive e dettagliate come quelle ottenute in *D. melanogaster*, e nella maggior parte dei casi si hanno soltanto notizie frammentarie o addirittura una totale mancanza di dati (Kubrakiewicz et al., 1998).

Per quanto riguarda *M. domestica*, i dati riguardano principalmente la descrizione delle fasi di sviluppo del follicolo, con particolare riguardo al tasso di crescita, mentre sono carenti le informazioni riguardanti lo sviluppo e le varie tipologie di cellule che costituiscono il germario, la morfologia dei vari territori in cui si differenziano le cellule follicolari e l'evoluzione del nucleo delle cellule nutrici e dell'oocita durante lo sviluppo. Di seguito saranno descritte le varie regioni che compongono l'ovariolo meroistico-politrofico dei Cyclorrhapha, con particolare riguardo alle varie tipologie di cellule che lo costituiscono.

Cellule del germario. Il germario contiene cellule sia della linea germinale sia di quella somatica. Queste si sviluppano e si accrescono in sincronia per portare ad un corretto sviluppo dell'oocita (King, 1970). Il germario comprende quattro regioni funzionali indicate come 1, 2A, 2B e 3 (Mahowald e Strasseim, 1970) (Fig. 1.3B, C).

1. La regione 1 prende contatto con la cellula situata nella posizione maggiormente posteriore del filamento terminale ed è adiacente a due o tre cellule somatiche dette "cap cells" (cellule cappuccio). Questa regione è inoltre caratterizzata nella parte anteriore da 2-3 cellule staminali della linea germinale e da cellule somatiche che formano un involucro attorno al germario, immediatamente sotto alle cellule cappuccio. Nella zona posteriore della regione 1 è presente uno strato di cellule che prendono contatto con gli oogoni e i cistoblasti: Sia le

cellule cappuccio sia le cellule che formano l'involucro sono mitoticamente quiescenti (Xie e Spradling, 1998). L'involucro contiene i cistoblasti, che si originano da una cellula staminale della linea germinale grazie ad una divisione mitotica. Questa divisione porta alla formazione di un cistoblasto e di una nuova cellula staminale, che andrà a occupare il posto della cellula staminale madre (King, 1970). Ogni cistoblasto sarà caratterizzato da 4 eventi mitotici con incomplete citodieresi, che portano alla formazione di un sincizio di 16 cellule (dette cistociti) che nel loro insieme sono identificate come "cisti germinale" (Ogienko et al., 2007).

Tra queste 16 cellule, 15 si differenzieranno in cellule nutrici e una in oocita (Chia e Morrison, 1972; Cardoen et al., 1986; Besse e Pret, 2003). Questa situazione è stata descritta in varie specie di ditteri, tra cui *Drosophila melanogaster*, *M. domestica*, *Sarcophaga bullata*, *Phormia regina* (Mazzini et al., 1986) e *Haematobia irritans* (Basso et al., 2011). I cistociti sono collegati da un numero variabile di ponti citoplasmatici (King, 1970), chiamati canali anulari (Brown e King 1964). Due cellule del sincizio hanno quattro canali ciascuna (pro-oociti), altre due cellule ne hanno tre, quattro cellule hanno due canali e le rimanenti otto cellule ne hanno solo uno (Ogienko et al., 2007). A seconda del loro numero anche il diametro dei canali varia: il diametro è inferiore a 1 μm nelle cellule che ne possiedono meno di quattro mentre il diametro è superiore a 2 μm nei due pro-oociti, che si caratterizzano per possedere quattro canali. I cistociti presentano inoltre un citoplasma denso, scarsa presenza di reticolo ed abbondanti ribosomi ed apparati di Golgi (Mahowald e Strassheim, 1970). Durante l'oogenesi i canali anulari permettono il passaggio di nutrienti tra le cellule che compongono il sincizio, in particolare in direzione dell'oocita in maturazione (Robinson et al., 1994). Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che le divisioni che caratterizzano le cellule staminali germinali, i cistoblasti e i cistociti sono fortemente orientate.

Questa forte orientazione è causata dalla presenza di uno specifico organulo cellulare, detto fusoma (Ogienko et al., 2007), individuato in molti ordini di insetti (Lin et al., 1994).

Nelle cellule staminali della linea germinale il fusoma è caratterizzato da una forma sferica, dalla presenza nel citoplasma di numerose piccole vescicole e dall'adesione alla cellula germinale nell'area di contatto con le cellule cappuccio in una regione definita spettrosoma ("spectrosome") (Ogienko et al., 2007; Yuan et al., 2012). Quando la cellula germinale si divide, lo spettrosoma si orienta e blocca il fuso mitotico ad uno dei poli della cellula. Lo spettrosoma in seguito si allunga in corrispondenza dell'asse maggiore del fuso durante l'anafase-telofase, ed il processo si conclude con una ineguale ripartizione tra le cellule figlie. La cellula che riceve la quantità maggiore di materiale spettrosomale rimarrà una cellula della linea germinale, mentre quella che ne riceve una quantità minore diventerà un cistoblasto (Deng e Lin, 1997). Nei cistoblasti e nei futuri cistociti il fusoma è costituito da residui di fusi

mitotici aggregati tra loro a seguito delle 4 divisioni e la sua struttura è caratterizzata da una morfologia ramificata, con i rami che attraversano i canali anulari che uniscono i cistociti (Grieder et al., 2000; Roth e Lynch, 2009).

2. Nella regione 2 del germario, che comprende le sottoregioni 2A e 2B, l'oocita derivante da uno dei due pre-oociti inizia a differenziarsi morfologicamente nella cisti (King, 1970). Il meccanismo alla base del suo differenziamento non è ancora del tutto chiaro e ne sono stati proposti due diversi modelli. Il primo modello è quello in cui il differenziamento dell'oocita avviene dopo il completamento delle mitosi che portano alla formazione della cisti germinale. In questo modello entrambe le cellule con quattro canali anulari sono considerate come pro-oociti, ma più tardi solo una delle due diverrà oocita, mentre l'altra diverrà una cellula nutrice come le altre 14. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che le due cellule con i quattro canali ad anello sono inizialmente difficili da distinguere e che entrambe entrano in meiosi, formando complessi sinapteinemali e accumulando materiale proveniente dalle cellule nutrici. A differenza del primo, il secondo modello propone un differenziamento del futuro oocita già al momento della prima divisione del cistoblasto che porta alla formazione dei primi due cistociti. Questo modello presuppone la presenza di "sistema di polarità" che si mantiene anche nelle successive divisioni ed è considerato valido da molti studiosi per la presenza del fusoma (De Cuevas e Spradling, 1998). Nella regione 2A del germario, solo nelle cellule caratterizzate da tre o quattro canali si possono osservare complessi sinapteinemali che suggeriscono l'inizio della meiosi. Quando le cisti entrano nella regione 2B, solo le cellule con quattro canali sono in profase I, mentre le altre cellule (quelle con tre canali) perdono il complesso sinapteinemale e diventano cellule nutrici. Il complesso sinapteinemale si conserverà solo in un pre-oocita, che successivamente svilupperà un vero e proprio oocita (Grieder et al., 2000). In quest'ultimo il DNA si condenserà formando il cariosoma e la meiosi si arresterà in profase I, fino a quando il follicolo non raggiungerà lo stadio identificato come stadio 10 in *D. melanogaster* (Ogienko et al., 2007). Il confine tra la regione 2A e la regione 2B è caratterizzato dall'invasione di cellule staminali somatiche di origine mesodermica (precursori delle cellule follicolari) (Mahowald e Strassheim, 1970). Il sincizio di 16 cellule che raggiunge la regione 2B è completamente sorretto e separato dagli altri sincizi grazie alle cellule follicolari di forma appiattita.

3. La regione 3 è caratterizzata dal fatto di alloggiare la cisti germinale di forma sferica, con l'oocita localizzato nella sua zona posteriore. Questa disposizione rappresenta uno dei primi segnali della formazione di un asse antero-posteriore nella futura camera follicolare.

Dopo la regione 3 il follicolo lascia il germario per entrare nel vitellario (King et al., 1956).

Cellule follicolari. Si tratta di cellule somatiche che si differenziano per formare due popolazioni cellulari nel follicolo, denominate rispettivamente cellule del peduncolo interfollicolare e cellule follicolari propriamente dette (Fig. 1.3D).

Le cellule del peduncolo interfollicolare sono cellule follicolari che si appiattiscono e vanno a formare un breve ponte di connessione tra follicoli adiacenti, costituito da 5 a 8 cellule.

Le cellule del peduncolo interfollicolare non appartengono all'epitelio cuboidale che circonda l'oocita e le cellule nutrici, in quanto non prendono mai contatto con questi due tipi cellulari.

Le cellule follicolari propriamente dette sono cellule che andranno a formare l'epitelio follicolare, costituito nella zona posteriore del germario dalle cellule prefollicolari che circondano l'oocita e le annesse cellule nutrici.

Durante l'oogenesi le cellule follicolari svolgono tre funzioni fondamentali:

- trasportano le proteine del tuorlo dall'emolinfa all'oocita;
- intervengono nella secrezione del corion nella coriogenesi;
- inviano segnali all'oocita per il suo corretto sviluppo (King, 1970; Chia e Morrison, 1972; Avancini e Mello, 1990).

Sia le cellule prefollicolari sia l'epitelio follicolare che delimita il follicolo ("egg chamber") hanno un aspetto cuboidale all'inizio della migrazione nel vitellario. Questo aspetto inizierà a modificarsi subito dopo l'entrata del follicolo nel vitellario, perché le cellule si moltiplicheranno e si differenzieranno in diverse e distinte sottopopolazioni cellulari.

La maggioranza (95%) di queste cellule ha un aspetto colonnare (epitelio colonnare) e circonda l'oocita, il restante 5% ha un aspetto squamoso (epitelio squamoso) e circonda le cellule nutrici (King, 1970). In seguito al processo vitello genetico, ai due poli del follicolo si differenziano due gruppi di cellule follicolari, composti da un massimo di cinque unità e denominate cellule polari. Presto però queste cellule cessano di dividersi, assumono una forma rotonda ed entrano in apoptosi, riducendo il loro numero a sole due coppie in entrambi i poli (Besse e Pret, 2003). La sopravvivenza di queste cellule è indispensabile per la successiva specializzazione delle altre cellule follicolari.

Come menzionato in precedenza, i primi stadi di sviluppo del follicolo si caratterizzano per numerose divisioni mitotiche a carico delle stesse cellule follicolari che cessano quando inizia il loro differenziamento ai lati delle cellule polari, sia al polo anteriore sia al polo posteriore. Quelle poste al polo anteriore sono denominate cellule terminali mentre quelle al polo posteriore sono dette "mainbody cells" (cellule del corpo principale).

Recentemente è stato dimostrato in *D. melanogaster* che queste cellule sono indotte a differenziarsi dalle cellule polari attraverso la via di segnalazione del recettore "Notch", espresso in cellule a potenzialità staminale, e la via di segnalazione delle Janus chinasi (JAK)

e delle proteine trasduttrici del segnale ed attivatrici della trascrizione (STAT), che regola la risposta cellulare alle citochine ed ai fattori di crescita. È stato inoltre dimostrato che entrambe le regioni terminali del follicolo sono originariamente simmetriche e che successivamente andranno incontro ad uno specifico differenziamento (Kubrakiewicz et al., 2003). In *D. melanogaster* l'iniziale simmetria verrà a mancare quando un segnale molecolare, rappresentato dalla proteina TGF α -like codificata dal gene *gurken*, è liberato dalla zona posteriore dell'oocita. Il segnale induce le cellule terminali, situate posteriormente, ad accompagnare le cellule polari ad occupare la zona posteriore del follicolo. Questo fenomeno stabilisce un asse antero-posteriore a livello dell'epitelio. Nella parte anteriore del follicolo le cellule della regione terminale non ricevono il segnale della proteina TGF α -like e questa mancanza porta al differenziamento di tre specifiche regioni cellulari (Jaglarz et al., 2008). La migrazione e il destino delle cellule follicolari sono stati studiati in dettaglio in *D. melanogaster* e in *Sarcophaga bullata*.

Di seguito sono sintetizzate le varie fasi della migrazione e del relativo differenziamento.

1. Spostamento delle cellule del corpo principale verso la zona posteriore, dove vanno a formare un epitelio colonnare intorno all'oocita (King, 1970; De Loof et al., 1990). In *M. domestica* queste cellule sono caratterizzate da un nucleo con un ampio nucleolo (French e Hoopingarner, 1965). L'ultrastruttura e le indagini autoradiografiche hanno dimostrato che solo queste cellule sono coinvolte nella sintesi della membrana vitellina, dell'endocorion e dell'esocorion (Giorgi, 1978). Chia e Morrison (1972) hanno inoltre dimostrato in *M. domestica* che le cellule del corpo principale sono in grado produrre i precursori delle proteine del vitello e di convogliarle dentro all'oocita grazie alla presenza di uno spazio intercellulare all'interfaccia oocita-cellule del corpo principale.

2. Contemporaneamente agli eventi del punto 1, le cellule terminali anteriori si differenziano in tre distinte sottopopolazioni: cellule allungate, cellule del bordo e cellule centripete (Jaglarz et al., 2008). Le cellule allungate (SC) si appiattiscono e si espandono formando un epitelio follicolare squamoso che circonda il comparto delle cellule nutrici. In *D. melanogaster* queste cellule raggiungeranno uno spessore estremamente sottile (intorno ai 50 μ m) durante l'accumulo del tuorlo (Ogienko et al., 2007). Le cellule del bordo (BC), che all'inizio circondano le cellule polari anteriori, in seguito migrano attivamente verso il polo anteriore dell'oocita (King, 1970; De Loof et al., 1990). Le BC subiscono una transizione epiteliale-mesenchimale e diventano invasive: la loro migrazione comprende una riorganizzazione del citoscheletro e la formazione di processi allungati che penetrano tra le cellule nutrici (Kubrakiewicz et al., 2003), coinvolgendo anche le cellule anteriori polari. Il gruppo in migrazione composto dalle cellule del bordo e dalle cellule polari ("border cell cluster")

conclude la sua migrazione a livello dell'interfaccia cellule nutrici - oocita. Il termine "border cell cluster" deriva dal fatto che questo gruppo di cellule si posiziona proprio a livello del bordo anteriore dell'oocita, ed è stato evidenziato in vari *Cyclorrhapha* (Goodman et al., 1968; Sakurai, 1973; Adams, 1974; De Loof et al., 1990; Montell 2003). Durante gli ultimi stati dell'oogenesi (corionogenesi) le cellule del bordo e le cellule polari rimangono in contatto con la parte anteriore dell'oocita e sono coinvolte nella formazione di una struttura specializzata dell'uovo, il micropilo, cioè il poro attraverso cui lo spermatozoo entra nell'uovo e lo feconda (Kubrakiewicz et al., 2003). Le cellule centripete migrano tra l'oocita e il comparto delle cellule nutrici, raggiungendo le cellule del bordo. In questo modo le cellule follicolari separano completamente l'oocita dalla regione delle cellule nutrici (Cummings e King, 1970; De Loof et al., 1990).

Cellule nutrici. Come precedentemente descritto, soltanto una delle 16 cellule che compongono il sincizio di cistoblasti matura in un oocita, mentre le altre 15 si differenziano in cellule nutrici (King, 1970). Dopo la formazione del sincizio le cellule nutrici escono dal ciclo mitotico e iniziano una serie di 10-12 endocicli (Cardoen et al, 1986; Avancini e Mello, 1990) che portano alla formazione di un nucleo poliploide in ciascuna cellula nutrice. In *D. melanogaster* i cromosomi delle cellule nutrici subiscono significativi cambiamenti (Hammond e Laird, 1985): per i primi quattro endocicli, caratterizzati da complete replicazioni del DNA (Dej e Spradling, 1999), i cromatidi sono strettamente associati e formano cromosomi politenici. Al quinto ciclo gli omologhi si accoppiano, formando nuclei con cinque larghe regioni ovali di cromatina, dette nel complesso "formazione blob-like" (Lilly e Spradling, 1996). La transizione tra la formazione "blob-like" e quella in cui i cromosomi sono maggiormente dispersi non avviene in maniera uniforme nelle cellule nutrici. Queste cellule sono infatti note per avere cicli cellulari non sincroni: la mancanza di sincronia si traduce in una situazione in cui le cellule nutrici posteriori sono sottoposte a endocicli più rapidi rispetto a quelle localizzate nell'area anteriore del follicolo (Dej e Spradling, 1999).

In *S. bullata* è stato inoltre notato un aumento del volume del nucleo delle cellule nutrici man mano che ci si allontana dalla zona anteriore del follicolo (Cardoen et al, 1986). Brown e King (1964) hanno suggerito che il volume del nucleo delle cellule nutrici, proporzionale al grado di endopoliploidia e al volume nucleolare, aumenti in funzione della velocità con cui sono rimossi i prodotti sintetizzati dalle stesse cellule. Maggiore è la superficie delle cellule nutrici che prende contatto con l'epitelio follicolare squamoso attraverso il quale il nutrimento extraovarico può transitare, più velocemente le cellule nutrici riceveranno i "precursori" e, allo stesso tempo, i prodotti della sintesi saranno rimossi e veicolati all'oocita. Convogliando il loro citoplasma verso l'oocita, le cellule nutrici compiono un'operazione di trasporto e di

trasferimento di sostanze di fondamentale importanza per lo sviluppo dell’oocita stesso (Robinson et al., 1994), come RNA e proteine (Bier, 1963; Hall et al., 1976).

In *D. melanogaster* è stato dimostrato che le cellule nutrici sono in grado di trasferire il loro citoplasma nell’oocita mediante un flusso graduale. I canali anulari provvedono quindi a trasferire il citoplasma dalle cellule nutrici all’oocita e, come risultato, l’oocita conterrà una varietà di componenti citoplasmatici sintetizzati dalle cellule nutrici appartenenti allo stesso sincizio germinale (King, 1970). In particolare, durante lo stadio 10B/11 dello sviluppo follicolare in *D. melanogaster* (King et al., 1956), si verifica un rapido trasporto di citoplasma dalle cellule nutrici verso l’oocita tramite i canali anulari, secondo un processo definito “nurse cell dumping” (Kubrakiewicz et al., 2003). Durante questo evento una rete di filamenti di actina polimerizzati va a circondare i nuclei, probabilmente per prevenire il loro movimento durante il trasporto (Cavaliere et al., 1998). Alla fine del processo i nuclei restano fuori dall’oocita e le cellule nutrici entrano in apoptosi, scomparendo definitivamente dal follicolo (King, 1970). Un recente studio ha dimostrato in *D. melanogaster* che anche le cellule nutrici che non hanno effettuato il “nurse cell dumping” presentano nuclei apoptotici: questi dati indicano che il riversamento del citoplasma nell’oocita non è la causa della loro morte programmata (Cavaliere et al., 1998). Lo studio di Velentzas e collaboratori (2007) su *Ceratitis capitata* propone che l’apoptosi operi sinergicamente con l’autofagia per una efficace eliminazione delle cellule nutrici degenerate e per l’eliminazione dei follicoli anormali.

Oocita. Il destino e la morfologia dell’oocita sono stati ampiamente studiati in *D. melanogaster*, in cui è stato evidenziato che la meiosi entra in profase I e si arresta in diplotene, per continuare solo al raggiungimento dello stadio 10 nella maturazione del follicolo (Ogienko et al., 2007). La meiosi continuerà poi fino alla metafase I, arrestandosi e in seguito riprendendo con l’entrata dello spermatozoo a livello degli ovidotti (Riparbelli e Callaini, 1996). Nel nucleo dell’oocita i cromosomi formano un cariosoma (descritto sia nei vertebrati sia negli invertebrati) dopo lo stadio di pachitene, caratterizzato da una ridotta sintesi di RNA. Il cariosoma è un tipico aggregato cromosomico del nucleo degli oociti (Büning, 1994; Świątek, 1999).

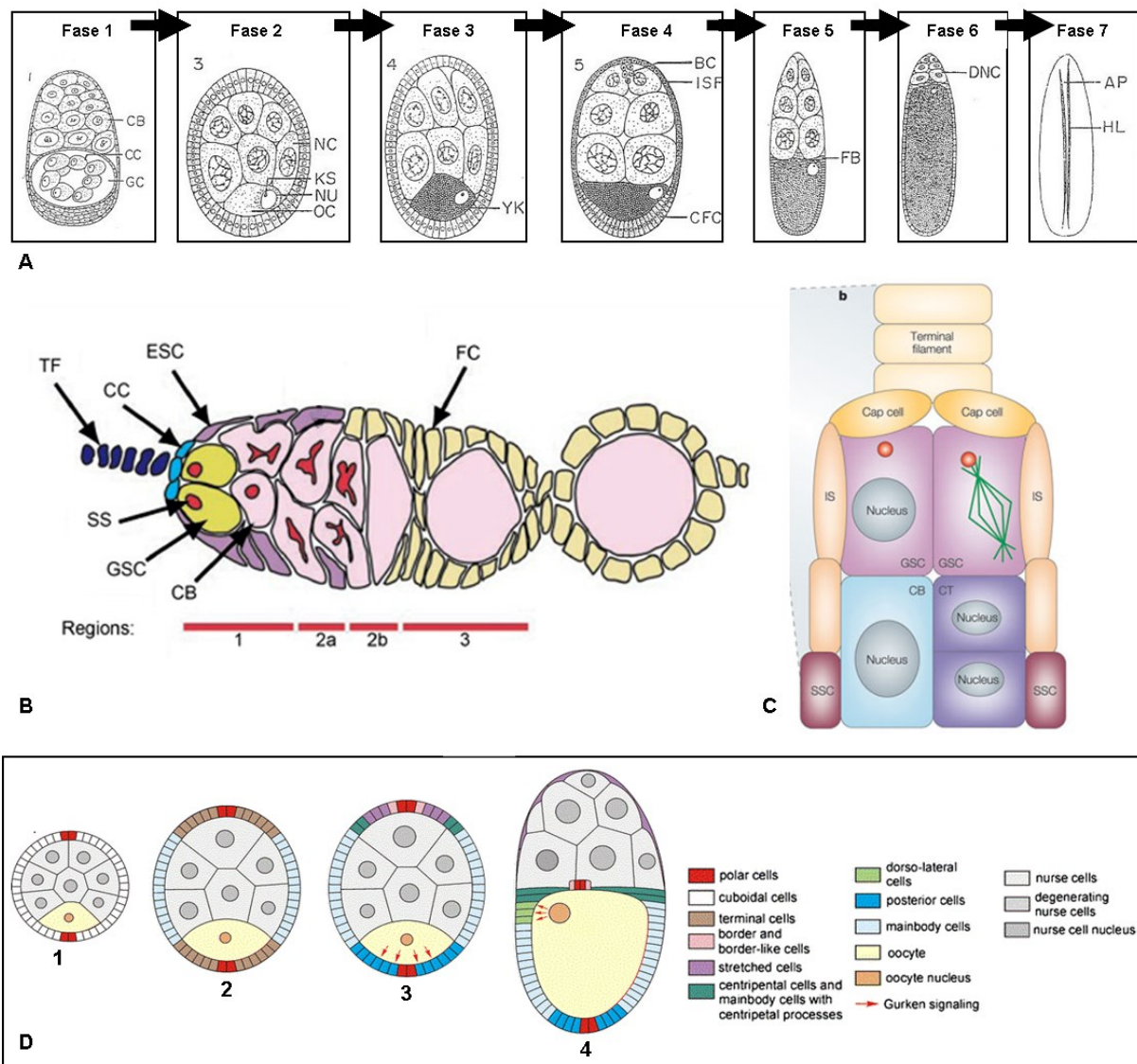


Fig. 1.3. Sviluppo dell'ovario in *M. domestica*. [A] Fasi dello sviluppo del follicolo. CB: cistoblasti; CC: cistociti; GC: cisti germinale; NC: nucleo di una cellula nutrice; KS: cariosoma; NU: nucleo; OC: oocita; YK: tuorlo; BC: border cell; ISF: cellule squamose; CFC: cellule follicolari colonnari; FB: ponte di cellule follicolari; DNC: cellule nutrici degenerate; AP: piastrone; HL: linee di schiusa. (Da Adams, 1974). [B] Germario. TF: filamento terminale; CC: cellule cappuccio; SS: spettrosoma; GSC: cisti germinale; ESC: epitelio squamoso; CB: cistoblasti; FC: cellule follicolari. (Da Kirilly e Xie, 2007). [C] Schema dettagliato della regione 1 e 2 del germario. [A] Fasi di differenziamento delle cellule follicolari (Jaglarz et al., 2008).

1.3 Sistema endocrino negli insetti

Gli insetti possiedono due diversi tipi di organi endocrini:

1. cellule neurosecretrici, o cellule neuroendocrine;
2. tessuti ghiandolari specializzati.

1. Le cellule neurosecretrici, dette anche cellule neuroendocrine, sono particolari neuroni dotati di un largo corpo cellulare che invece di effettuare attività di neurotrasmissione sintetizza piccoli polipeptidi, i neurormoni o neuropeptidi. Queste cellule sono presenti in tutto il sistema nervoso, da quello centrale a quello periferico fino al sistema nervoso stomodeale, ma i gruppi di maggiori dimensioni sono localizzati nel protocerebro.

Le cellule mediane neurosecretrici del protocerebro non rilasciano i neurormoni (in particolare l'ormone protoracicotropo, ProThoracicoTropic Hormone, PTTH) in prossimità delle loro sinapsi, ma li inviano tramite i loro assoni a strutture neuroemali specializzate, da cui successivamente vengono riversate nell'emolinfa. Queste strutture possono essere rappresentate da semplici aree o da organi anatomicamente compatti che prendono il nome di corpora cardiaca. I corpora cardiaca, così denominati per la loro stretta associazione con la porzione anteriore del vaso dorsale, liberano nell'emolinfa i neurormoni precedentemente accumulati.

Negli insetti sono generalmente presenti una coppia di corpora cardiaca, ad eccezione dei ditteri superiori nei quali i corpora cardiaca, sono uniti in una struttura unica e fanno parte dell'anello di Weismann insieme ai corpora allata ed alle ghiandole protoraciche (Scheer, 1961; Nijhout, 1994). I corpora cardiaca possono contenere un numero di cellule neurosecretrici intrinseche che conferiscono capacità di sintesi neurormonale.

Questo è il caso dell'ormone adipocinetico sintetizzato nei corpora cardiaca di *Locusta migratoria* e di *Vanessa cardui* (Schooneveld et al. 1983; Meola et al., 1999; Köllisch et al., 2000).

2. I principali tessuti ghiandolari specializzati degli insetti sono le ghiandole protoraciche, i corpora allata, gli ovari e i testicoli (Nijhout, 1994).

Le ghiandole protoraciche sono vere e proprie ghiandole endocrine deputate alla sintesi degli ecdisteroidi, ormoni di fondamentale importanza sia durante lo stadio preimmaginale, sia durante lo stadio immaginale (Gäde et al., 1997). In generale queste ghiandole sono localizzate nel protorace, ma in alcune specie si estendono nel mesotorace e, occasionalmente, anche nel metatorace. La loro morfologia e la loro organizzazione sono molto variabili a seconda dell'ordine di insetti preso in esame (Nijhout, 1994). Ad esempio negli Orthoptera si presentano come un paio di ghiandole formate ciascuna da due bande allungate che si

incrociano nel protorace (Scharrer, 1948); nei Lepidoptera hanno l'aspetto di una larga banda (Hintze-Podufal, 1970); nei Blattaria sono a forma di croce (Bernardini Mosconi e Cella-Malugani, 1960) e negli Heteroptera sono formate da due bande che decorrono parallelamente alle ghiandole salivari (Wells, 1954). Come precedentemente menzionato, un caso molto particolare è quello dei Cyclorrhapha, in cui queste ghiandole sono integrate nell'anello di Weismann (Cassier, 1979). Le ghiandole protoraciche si sviluppano ed iniziano a funzionare negli ultimi stadi dell'embriogenesi: la loro attività si manifesta durante tutti gli stadi larvali, ma in molte specie degenerano all'ultima muta larvale o subito dopo la metamorfosi (Gäde et al., 1997).

I corpora allata sono ghiandole endocrine presenti durante tutta la vita degli insetti, scoperte per la prima volta nelle formiche da Frederik Vilhelm Meinert nel 1861. La loro potenziale funzione endocrina è stata identificata nel 1913 grazie al lavoro di Arthur Nabert (Cassier, 1979). Le ipotesi sull'attività endocrina dei corpora allata sono state poi confermate da Vincent Wigglesworth grazie ai suoi esperimenti di parabiosi in *Rhodnius prolixus* (Gilbert, 2013). I corpora allata sono il sito di produzione e secrezione degli ormoni giovanili (diversi tipi di juvenile hormone, JH), che presentano funzioni differenti a seconda dello stadio di sviluppo dell'animale. In particolare i JH intervengono durante lo sviluppo postembrionale dell'insetto, determinando la permanenza dei caratteri giovanili, mentre nello stadio adulto sono indispensabili per lo sviluppo ovarico (King, 1970). A seconda dell'ordine di insetti preso in esame i corpora allata presentano specifiche caratteristiche che riguardano morfologia, posizione e differente grado di associazione con la ghiandola protoracica e i corpora cardiaca. Cassier (1979), in riferimento ai dati raccolti da Cazal del 1948, ne descrisse cinque morfotipi (Fig. 1.4A). Il primo, o morfotipo lateralizzato, è stato individuato negli ordini di insetti più primitivi (Isoptera, Phasmatodea, Heteroptera) ed è caratterizzato dalla presenza di due corpora allata disposti lateralmente al tubo digerente e collegati singolarmente ai nervi che collegano corpora allata e corpora cardiaca, detti nervi allatocardiaci. Il morfotipo distale lateralizzato è stato individuato in varie specie di Diptera e Coleoptera e differisce dalla precedente tipologia per l'adesione omolaterale dei corpora allata e dei corpora cardiaca. Il morfotipo semicentralizzato (il più comune) è stato riscontrato in Ephemeroptera, Odonata, Mantodea, Blattaria e Orthoptera, ed è caratterizzato da una fusione sagittale dei corpora cardiaca (corpus paracardiacum) che prendono contatto direttamente con l'aorta e con il ganglio ipocerebrale. I corpora allata restano distinti, mentre i nervi allatocardiaci possono rimanere separati come in Orthoptera, o unirsi come in Mantodea e Blattaria: questa caratteristica dipende dall'estensione del contatto tra corpora cardiaca e corpora allata. In questo caso i corpora allata formano un'unica massa localizzata al di sopra dell'aorta, a diretto

contatto con i corpora cardiaca. L'intima associazione tra le due ghiandole le fa apparire come un singolo elemento, portando alla formazione del morfotipo centralizzato. Il morfotipo anulare è considerato caratteristico dei Cyclorrhapha e allo stadio larvale appare come una fusione di corpora allata, corpora cardiaca e ghiandole protoraciche, rispettivamente posizionati ventralmente e lateralmente all'aorta. Lateralmente ciascun elemento dei corpora allata riceve un nervo proveniente dai corpora cardiaca (nervi allatocardici). Gli assoni che formano questi nervi provengono dalle cellule neurosecretrici mediane del protocerebro e probabilmente vi è anche la presenza di assoni provenienti dal ganglio subesofageo (Gillott, 2005). La fusione di corpora allata, corpora cardiaca e ghiandole protoraciche determina una struttura anulare detta ghiandola ad anello, o anello di Weismann in onore di August Weismann, che nel 1864 scoprì nello stadio larvale di *Calliphora vomitoria* un organo a forma di anello che circondava l'aorta e che considerò un organo con funzioni meccaniche per il sostegno del vaso stesso (Thomsen, 1951). La presenza di due nervi allatocardici sostiene l'ipotesi di Arthur Nabert secondo cui la condizione impari del corpora allata rappresenta una condizione secondaria rispetto a quella pari, tipica di molti ordini di insetti, che rappresenterebbe la condizione primaria. (Thomsen, 1942). L'anello di Weismann inizia la sua formazione allo stadio larvale e si mantiene anche nello stadio adulto, subendo modificazioni riguardanti in particolare la sua localizzazione e la degenerazione delle ghiandole protoraciche (Cassier, 1979).

1.3.1 Anello di Weismann

Negli stadi preimmaginali l'anello di Weismann giace dorsalmente ed in posizione mediana rispetto ai due emisferi del ganglio cerebrale, con la porzione dorsale inclinata anteriormente. In posizione laterale appare confinante con due larghe trachee collegate tra loro da un tronco che decorre in senso trasversale attraverso la porzione dorsale della ghiandola. L'anello è costituito da quattro tipi cellulari: cellule delle ghiandole protoraciche, cellule dei corpora allata, cellule dei corpora cardiaca e cellule che rivestono le trachee (King, 1970) (Fig. 1.4B). Dopo la metamorfosi l'anello di Weismann si localizza nella porzione anteriore del torace, a livello della regione di connessione del collo con il protorace (Thomsen, 1940; King et al., 1966). Nel corso degli anni si sono susseguite varie indagini morfologiche riguardanti l'anello di Weismann e le sue componenti: le ghiandole protoraciche generalmente vanno incontro a degenerazione durante la metamorfosi, ma a volte permangono come strutture ancora in corso di degenerazione durante lo stadio adulto, ad esempio in *M. domestica* fino a 72 ore dallo sfarfallamento (Sakurai, 1977). La degenerazione determina la messa allo scoperto dei nervi allatocardici e la formazione dell'anello di Weismann adulto, costituito solo da corpora cardiaca e da corpora allata, dotato delle seguenti caratteristiche:

- la superficie esterna è circondata da uno stroma, o tunica acellulare, che svolge la funzione di barriera selettiva per le molecole con peso molecolare relativamente elevato;
- le cellule dei corpora allata hanno contorni irregolari, canali che le mettono in comunicazione tra loro e abbondante reticolo endoplasmatico liscio; in particolare, in *D. melanogaster* si evidenziano aree cellulari concentriche, denominate “corpi allati”;
- le cellule dei corpora allata hanno nuclei di forma ellissoidale o sferica: in *Calliphora erythrocephala* vi sono molte cellule con nuclei di piccole dimensioni, mentre in *M. domestica* si riscontra una situazione opposta, cioè poche cellule con nuclei di notevoli dimensioni. Studi storici ultrastrutturali hanno distinto nell'organo in attività due tipi cellulari non meglio identificati (Thomsen, 1942; Cassier, 1979).
- in funzione della sua attività, l'anello subisce una variazione volumetrica dovuta alle divisioni mitotiche, come dimostrato nell'eterottero *Oncopeltus fasciatus*, nel quale la ghiandola cresce non a causa di un aumento numerico di cellule, ma a causa di ipertrofia dovuta all'aumento del volume cellulare (Cassier, 1979).

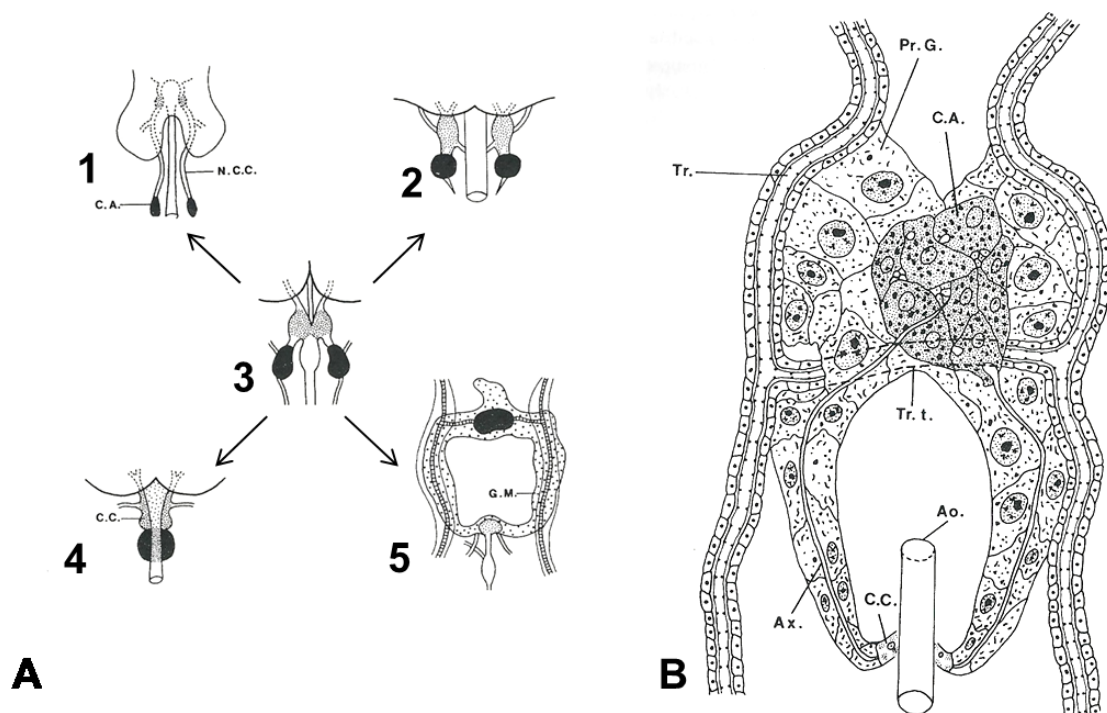


Fig. 1.4. Tessuti ghiandolari specializzati negli insetti. [A] Morfotipi dei corpora allata. 1: morfotipo lateralizzato (Isoptera, Phasmatodea, Heteroptera); 2: morfotipo distale lateralizzato (Diptera, Coleoptera); 3: morfotipo semicentralizzato (Ephemeroptera, Odonata, Mantodea, Blattaria, Orthoptera); 4: morfotipo centralizzato (Plecoptera, Embioptera, Dermaptera, Psocoptera, Hemiptera); 5: morfotipo anulare (Diptera Cyclorrhapha). C.A.: corpora allata; N.C.C.: nervi dei corpora cardiaci; Cerv.: ganglio cerebrale; Gg.Ss.Oe.: ganglio sottoesofageo; G.M.: ghiandola pro toracica; Ao.: aorta. (Cassier, 1979). [B] Anello di Weismann in *Drosophila melanogaster*. Pr.G.: ghiandola pro toracica; C.A.: corpora allata; Tr.: trachea; Tr.t.: trachea trasversale; Ao.: aorta; C.C.: corpora cardiaci; Ax.: assone. (Da King, 1970).

1.4 Principali neurormoni e ormoni degli insetti coinvolti nella riproduzione

La riproduzione degli insetti è regolata da neurormoni quali il neurormone ovarico ecdisteroidogenico (“ovary ecdysteroidogenic hormone”, OEH), il neurormone ovarico ecdisteroidostatico (“ovary ecdysteroidostatic hormone”, OES) e da ormoni giovanili (JH), ecdisteroidi e dall’ormone oostatico. Durante lo stadio adulto queste molecole sono coinvolte nella regolazione della vitellogenesi nelle femmine e della spermatogenesi nei maschi, intervenendo, inoltre, nella crescita delle ghiandole riproduttive accessorie dei maschi (Nijhout, 1994; Hoffmann et al., 1999).

1.4.1 Neurormoni ovarici

Il neurormone ovarico ecdisteroidogenico (OEH), noto anche come ormone neurosecretorio per lo sviluppo delle uova (“egg development neurosecretory hormone”, EDNH) è un neurormone che induce la sintesi degli ecdisteroidi da parte degli ovari (Nijhout, 1994). In *M. domestica* si tratta di un peptide con peso molecolare 8.1 kDa, rilasciato all’inizio della vitellogenesi e fortemente legato all’assunzione di una dieta proteica da parte della femmina. Il neurormone ovarico ecdisteroidostatico (OES) ha la funzione di inibire la sintesi degli ecdisteroidi a livello degli ovari (Adams e Li, 1998).

1.4.2 Ormoni giovanili (JH)

Come precedentemente accennato, questa categoria di ormoni è stata scoperta per la prima volta nel 1934 da Vincent Wigglesworth, che evidenziò una sostanza umorale proveniente dal capo di *Rhodnius prolixus* in grado di prevenire la metamorfosi e, di conseguenza, impedire lo sviluppo dei caratteri immaginali. All’inizio questa sostanza fu denominata “ormone inibitore”, ma più tardi le fu conferito il nome di “ormone giovanile” (Riddiford, 1996).

La categoria degli ormoni giovanili è probabilmente la più versatile nel mondo animale (Nijhout, 1994) e riveste un ruolo fondamentale in molti processi, non solo in quelli legati allo sviluppo e alla riproduzione: tra questi vi sono embriogenesi, muta, metamorfosi, determinazione delle caste negli insetti sociali, sintesi della vitellogenina, sviluppo ovarico, determinazione delle fasi nelle locuste e negli afidi, regolazione della diapausa, della colorazione, del polimorfismo e così via (Gäde et al., 1997). Gli ormoni giovanili possono essere indicati con varie denominazioni, come ad esempio ormone inibitore della metamorfosi o neotenina, in riferimento alla sua funzione negli stadi giovanili dell’insetto, e ormone gonadotropo, in riferimento alla sua potenziale azione sulla riproduzione (Gillott, 2005).

Gli ormoni giovanili sono sesquiterpenoidi con un gruppo epossidico a una estremità e un gruppo metilico in quella opposta (Wyatt, 1997). Sono stati identificati sette diversi ormoni giovanili con struttura chimica simile, classificati in base al numero di atomi di carbonio

(Gäde et al., 1997) e presenti singolarmente o in miscele composite, come nel caso dei lepidotteri e dei ditteri (Gilbert et al., 2000).

Di seguito sono indicati gli ormoni giovanili noti fino ad oggi.

1. JH-I: primo ormone giovanile identificato nel tessuto addominale del maschio del lepidottero *Hyalophora cecropia* (Williams, 1956) e caratterizzato da 18 atomi di carbonio (Meyer et al., 1971). Questo ormone è stato in seguito identificato anche nelle femmine dei lepidotteri *Choristoneura fumiferana* e *Choristoneura rosaceana* (Cusson et al., 1999).

2. JH-0: ormone isolato dall'embrione di *Manduca sexta*, caratterizzato da 19 atomi di carbonio. È il primo ormone giovanile identificato nelle uova di insetto e questa scoperta ha confermato l'attività di questa categoria di molecole anche durante lo sviluppo embrionale (Bergot et al., 1980).

3. JH-II: identificato nel lepidottero *Hyalophora cecropia*, caratterizzato da 16 atomi di carbonio (Meyer et al., 1971) ed isolato successivamente anche in altri lepidotteri allo stadio larvale e nelle femmine adulte di *Trichoplusia ni*, *C. fumiferana* e *C. rosaceana* (Jones et al., 1990; Cusson et al., 1999).

4. JH-III: identificato per la prima volta nel lepidottero *M. sexta* (Schooley et al., 1973) e in seguito in altri lepidotteri come *Choristoneura fumiferana*, *Choristoneura rosaceana* e *Heliothis virescens* (Cusson et al., 1999). Indagini estese ad altri gruppi di insetti hanno dimostrato come JH-III sia molto diffuso tra i vari ordini: è stato infatti isolato in ninfe e adulti di femmine degli ortotteri *Schistocerca vaga* e *Locusta migratoria* (Judy et al., 1973; Bergot et al., 1981a), negli adulti dei ditteri *Drosophila melanogaster* e *Phormia regina* (Richard et al., 1989; Yin et al., 1995) nello stadio embrionale del coleottero *Tenebrio molitor* (Judy et al., 1975) e in embrioni dei blattodei *Diploptera punctata*, *Blattella germanica*, *Supella longipalpa*, *Leucophaea maderae*, *Nauphoeta cinerea*, *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana* (Stay et al., 2002; Li, 2007);

5. 4-metil-JH-I: come il JH-0, anche questo ormone è stato isolato da embrioni di *M. sexta* ed è caratterizzato da 19 atomi di carbonio (Bergot et al., 1981b);

6. MF (metil-farneosato): identificato per la prima volta negli embrioni di *Nauphoeta cinerea* (Brüning et al., 1985) e successivamente negli embrioni di diverse specie di blatte ovipare e vivipare (Li, 2007), nelle femmine adulte di *Heliothis virescens* (Teal e Proveaux, 2006) e negli adulti di entrambi i sessi di *Phormia regina* (Yin et al., 1995). Le indagini effettuate su queste specie inducono a ritenere che questo ormone giovanile sia il precursore del JH-III.

7. JHB₃: identificato per la prima volta nelle larve di *Drosophila melanogaster* e successivamente in quelle di altri ditteri superiori, come *Musca domestica*, *Sarcophaga*

bullata e *Calliphora vicina* (Richard et al., 1989) e negli adulti di *Phormia regina* (Yin et al., 1995).

1.4.3 Ecdisteroidi

Gli ecdisteroidi sono una categoria di steroidi con struttura simile all'ecdisone (α -ecdisone) e al 20-idrossiecdisone (β -ecdisone o 20E), i primi ecdisteroidi purificati (Nijhout, 1994).

Gli ecdisteroidi sono genericamente indicati come ormoni della muta e sono noti per il loro ruolo fondamentale in molte fasi della vita di un insetto, dallo sviluppo embrionale a quello postembrionale ed adulto, in particolare durante la riproduzione (Baltaev e Shangaraeva, 2000). Data la loro ubiquità nei vari stadi del ciclo di sviluppo degli insetti è stata avanzata l'ipotesi di una loro capacità stadio-specifica e di una loro sintesi in vari distretti corporei (Koolman, 1990). Negli insetti sono stati finora identificati ben 70 ecdisteroidi, che differiscono tra loro per il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici, liberi o coniugati con gruppi polari o apolari (Lafont et al., 2012). L'ecdisteroide più conosciuto è l'ecdisone, che in effetti non è il vero ormone della muta, ma un pro-ormone che per esercitare la propria attività deve essere attivato tramite una idrossilazione: la reazione forma il vero ormone della muta, il 20-idrossiecdisone (20-E) (Nijhout, 1994). Nella via generale di biosintesi degli ecdisteroidi negli insetti (Fig. 1.5) il colesterolo è trasformato in 7-deidrocolesterolo dall'enzima microsomiale P450-7,8-deidrogenasi. Il 7-deidrocolesterolo è quindi trasportato nei mitocondri, dove subisce una serie di reazioni non ancora del tutto chiarite che lo trasformano in un intermedio ipotetico, il 14 α -idrossi-colestan-4,7-dien-3,6-dione. L'intermedio è trasformato in 5 β -dichetolo dall'enzima citosolico 5 β -reduttasi. Parte delle molecole di 5 β -dichetolo sono trasformate in 5 β -chetodiolo per idrossilazione. Entrambi i precursori degli ecdisteroidi sono rispettivamente trasformati dalla citocromo P450-25-idrossilasi microsomiale (CYP306A1) in 2,22-dideossi-3-deidroecdisona e 2,22-dideossiecdisona: queste due molecole sono ritrasportate nei mitocondri, nei quali sono trasformate dalla P450-22-idrossilasi (CYP302A1) rispettivamente in 2-deossi-3-deidroecdisona e 2-deossiecdisona. In seguito la P450-2-idrossilasi mitocondriale (CYP315A1) li converte rispettivamente in 3-deidroecdisona ed ecdisona. I due ecdisteroidi sono liberati nel citosol, dove il 3-deidroecdisona è trasformato in ecdisona dalla 3-deidroecdisona 3 β -reduttasi. L'ecdisona è quindi secreto dal tessuto ecdisiale e trasformato in 20-idrossiecdisona da parte della P450-20-idrossilasi mitocondriale (CYP314A1) in alcuni tessuti periferici (Brown et al., 2009). Negli insetti zoofagi la biosintesi degli ecdisteroidi inizia dal colesterolo assunto con la dieta, perché questo gruppo di insetti non è in grado di sintetizzarlo. Negli insetti fitofagi, gli ecdisteroidi si ottengono invece tramite dealchilazione di steroli vegetali come il campesterolo, il sitosterolone e lo stigmasterolo (Lafont e Koolman, 2009). Questa varia

tipologia di steroli, assunti in modo diverso da zoofagi e da fitofagi, porta alla produzione di ecdisteroidi differenti. È stato infatti notato che l'ecdisone, che ha come precursore il colesterolo, è abbondante negli insetti zoofagi e onnivori, mentre in quelli con dieta prettamente fitofaga sono presenti altri ecdisteroidi. Negli emitteri, ad esempio, vi è una relazione tra il metabolismo degli steroli assunti e la natura chimica dell'ormone della muta. Gli emitteri predatori ed ematofagi producono il 20-idrossiecdisone (ottenuto dall'ecdisone) e il C27-ecdisteroide, mentre quelli fitofagi presentano come ormone predominante il makisterone A e il C28-ecdisteroide. Il makisterone A è stato inoltre isolato in *Apis mellifera* (Feldlaufer et al., 1985) e in alcuni ditteri come *D. melanogaster* e *M. domestica*: questi insetti sono in grado di produrlo a partire dal campesterolo, ma il loro ecdisteroide preponderante è il C27-ecdisteroide, a causa della loro dieta onnivora contenente colesterolo. Il sito di sintesi degli ecdisteroidi sono le ghiandole protoraciche durante gli stadi larvali, ma considerando il fatto che questi ormoni sono coinvolti anche in vari processi riproduttivi dell'adulto e, come precedentemente accennato, queste ghiandole degenerano con il passaggio dell'insetto allo stadio adulto, sono state intraprese indagini per identificare altri siti di biosintesi di questi ormoni (Gäde et al., 1997). Attualmente è noto che, oltre alle ghiandole protoraciche, l'organo ecdisonsintetico (sorgente primaria in grado di convertire uno sterolo precursore in ecdisteroide attivo o in un suo pro-ormone) è l'ovario ed in particolare le cellule follicolari. Oltre a questa sorgente primaria sono state identificate anche sorgenti secondarie, in grado solo di riciclare ecdisteroidi, come ad esempio i testicoli, gli enociti (ghiandole unicellulari dislocate nel tegumento) e l'epidermide (Hagedorn et al., 1975; Delbecque et al., 1990; Hoffmann, 1992; Gäde et al., 1997). L'ecdisteroide più conosciuto è l'ecdisone, sintetizzato dagli organi ecdisonsintetici e rilasciato nell'emolinfa: la sua attivazione in 20-idrossiecdisone avviene nei corpi grassi, nei tubuli malpighiani, nell'intestino e nell'epidermide (Koolman, 1990).

1.4.4 Ormone oostatico

Oltre agli ormoni precedentemente menzionati esistono anche molecole ad attività antigonadotropica, o fattori che inibiscono lo sviluppo delle uova: questi ormoni sono stati identificati in varie specie, tra cui alcuni ditteri. Gli studi di Borovsky (1985) hanno dimostrato in *Aedes aegypti* la presenza di un ormone oostatico ("trypsin-modulating oostatic factor", TMOF), costituito da dieci peptidi, che controlla la sintesi della vitellogenina e la deposizione del vitello. L'ormone è secreto dall'ovario di *A. aegypti* 18 ore dopo il pasto di sangue, e sulle larve ha un effetto larvicida poiché blocca la biosintesi di tripsina, interrompendo la digestione (Borovsky, 1985). Sembra che in *A. aegypti* l'ormone non blocchi l'azione dell'OEH ma agisca direttamente sull'ovario, il cui sviluppo è legato al pasto

di sangue. Anche in *M. domestica* è stata identificata la presenza dell'ormone oostatico (Li e Gong, 1995). Questo ormone non è tuttavia specie-specifico ed è uno dei fattori principali che controllano la ciclicità dello sviluppo ovarico in molti insetti. La descrizione della sua attività è rinviata al paragrafo riguardante l'azione degli ormoni sullo sviluppo ovarico di *M. domestica*.

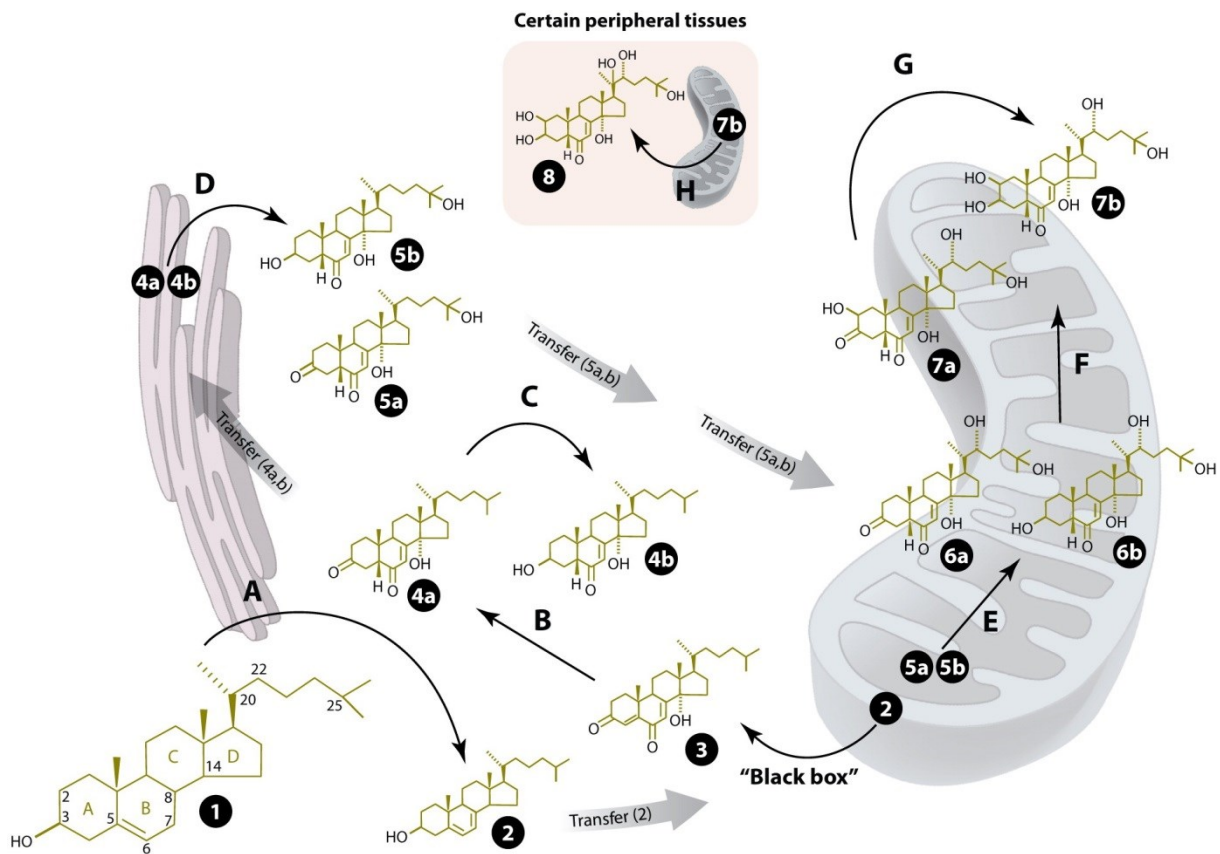


Fig. 1.5. Schema della biosintesi degli ecdisteroidi. (Da Brown et al., 2009).

1.4.5 Azione degli ormoni sullo sviluppo ovarico di *M. domestica*

Il processo di maturazione delle uova può essere controllato in vari punti e può essere fortemente specie-specifico. Negli insetti gli ecdisteroidi, gli ormoni giovanili e vari neurormoni agiscono nei seguenti processi legati allo sviluppo ovarico: sintesi della vitellogenina (proteina del tuorlo) nei corpi grassi, separazione di un nuovo follicolo dal germario, crescita previtellogenetica dell'oocita ed infine vitellogenesi (assorbimento delle proteine del tuorlo da parte dell'oocita).

In natura non esiste uno schema unico nelle modalità di intervento e di controllo esercitato da queste molecole: il quadro risulta notevolmente eterogeneo (Nijhout, 1994). In *M. domestica* la maggior parte delle informazioni riguardanti il controllo ormonale della riproduzione nelle femmine proviene dagli studi di Adams e Li (1998). Usando come schema di sviluppo follicolare quello proposto da Adams (1974), il JH determina l'attivazione del follicolo per raggiungere lo stadio 3 dello sviluppo ovarico: infatti è risultato che le femmine allatectomizzate con follicolo primario in stadio 2 subivano un arresto dell'oogenesi, mentre nelle femmine che avevano subito la stessa operazione allo stadio 3, l'oogenesi procedeva normalmente (Adams, 1981). Il JH sembra inoltre aumentare la sensibilità dei tessuti deputati alla produzione della vitellogenina verso gli ecdisteroidi sintetizzati dall'ovario, che rappresentano gli induttori di questa produzione (Adams e Filipi, 1988; Nijhout, 1994).

Come nel caso della sintesi degli JH da parte dei corpora allata, controllata da neurormoni allotropici (allotropine) e allostatici (allostatine), anche la sintesi ovarica degli ecdisteroidi presenta una regolazione da parte di neurormoni ecdisteroidogenici e ecdisterostatici. Se la femmina ha assunto proteine nella dieta, l'OEH (neurormone ecdisteroidogenico) è rilasciato all'inizio della vitellogenesi, inducendo la sintesi degli ecdisteroidi a livello ovarico.

L'attività ecdisterostatica è esercitata da OES (neurormone ecdisterostatico) durante la fine della vitellogenesi e la post-vitellogenesi (Adams e Li, 1998). Grazie alla presenza dell'ormone oostatico, l'ovario di *M. domestica* può svilupparsi in modo ordinato: quando il primo ordine di follicoli è in vitellogenesi o in postvitellogenesi, il secondo ordine di follicoli non può entrare in vitellogenesi. Questo determina nell'ovario una sincronizzazione sia all'interno degli ovaroli (intraovariolare) sia tra i singoli ovaroli (interovariolare) (Li e Gong, 1995). L'ormone oostatico probabilmente esplica la sua azione tramite un'inibizione dell'assorbimento della vitellogenina e del rilascio degli ormoni gonadotropici (Adams e Li, 1998).

1.5 Insetticidi

Gli insetticidi sono una particolare categoria di pesticidi. Con il termine “pesticida” (dall’inglese “pest”, “specie nociva”) si intende qualsiasi sostanza chimica (o miscela di sostanze) in grado di prevenire, distruggere, respingere o controllare una specie nociva (non necessariamente animale, poiché tra i pesticidi sono inseriti anche gli erbicidi e i fungicidi). L’agenzia per la protezione ambientale americana (Environmental Protection Agency, o EPA) ha approvato fino ad oggi circa 900 principi attivi usabili come pesticidi, dei quali gli insetticidi rappresentano il 25%. L’uso degli insetticidi è regolato da leggi diverse a seconda degli Stati. Ad esempio, negli Stati Uniti tre principali leggi e tre agenzie federali (EPA, Food and Drug Administration o FDA, e U.S. Department of Agriculture, o USDA) stabiliscono le regole d’uso degli insetticidi (Yu, 2008). In Italia in ambito normativo, un insetticida, o altro principio attivo ad azione biocida, è definito (a seconda dell’uso) come presidio medico-chirurgico o prodotto fitosanitario, mentre in ambito tecnico è usato il termine fitofarmaco, o quello (improprio) di antiparassitario. I regolamenti per l’uso degli insetticidi sono di competenza del Ministero della Salute: gli insetticidi impiegati contro *M. domestica* in Italia sono classificati come presidi-medico-chirurgici in base alla direttiva 98/8/CE, articolo 16, e al regolamento CE n. 1451/2007 (e successivi aggiornamenti).

1.5.1 Classificazione degli insetticidi di sintesi

Le quattro classi principali di insetticidi sintetici, che rappresentano insieme più del 70% del mercato mondiale (Nauen, 2006), sono gli organofosfati, i carbammati, i piretroidi e i neonicotinoidi, tutti accumulati dall’agire a livello del sistema nervoso.

- Gli organofosfati, (inibitori dell’acetilcolinesterasi) frutto degli studi condotti in Germania durante la Seconda Guerra Mondiale per la produzione di armi chimiche (come i terribili gas “sarin” e “tabun”) sono una vasta classe di insetticidi altamente tossici ad attività neurotossica, accomunati dalla derivazione dall’acido ortofosforico, in cui gli atomi di idrogeno sono sostituiti da radicali organici (metile o fenile), o da atomi di zolfo, carbonio o azoto.

- I carbammati (inibitori dell’acetilcolinesterasi) sono esteri dell’acido carbammico in cui gli atomi di idrogeno sono sostituiti da radicali alifatici o aromatici: un esempio classico è l’1-naftil metilcarbammato (carbaryl). Tra i carbammati vi è anche il 2-(1-metiletossi)fenil metilcarbammato (propoxur), impiegato frequentemente come insetticida per contatto o ingestione contro scarafaggi, formiche e altri insetti del terreno. I carbammati sono tristemente famosi per la grave tragedia avvenuta nel 1984 nell’impianto chimico Union Carbide di Bhopal (India), in cui molta acqua fu aggiunta accidentalmente al serbatoio contenente il gas metilisotiocianato richiesto per la sintesi dei carbammati. L’esplosione che

ne seguì disperse il velenosissimo metilisotiocianato nella regione circostante, uccidendo circa 3800 persone e ferendone gravemente altre migliaia. Il terribile incidente di Bhopal è considerato il maggiore disastro industriale della storia.

- I piretroidi (inibitori dei canali sodio voltaggio-dipendenti) sono insetticidi che derivano dal piretro. Il piretro naturale è estratto tramite solventi dai fiori essiccati di *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Magnoliopsida Asteraceae) ed è costituito da quattro ingredienti attivi (piretrine), esteri derivati dalle varie combinazioni di due alcoli (piretrolone e cinerolone) con due acidi (acido crisantemico e acido piretrico). Il piretro è un insetticida ad elevato livello di sicurezza per i vertebrati e con grande rapidità di azione (paralizzante) sugli insetti: è generalmente somministrato come aerosol per prolungarne l'attività. Dal punto di vista agricolo il piretro non è efficace a causa della sua instabilità alla luce solare, ma i suoi derivati sintetici fotostabili (piretroidi) hanno notevolissima efficacia e grande importanza in campo agricolo e medico-veterinario. Il piretroide più noto è il 3-fenossibenzil-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarbossilato, comunemente noto come permethrin (Yu, 2008).

- I neonicotinoidi (con attività acetilcolinomimetici) sono una nuova classe di insetticidi analoghi della nicotina, ma, al contrario di questa, relativamente non tossici per i mammiferi. Sono insetticidi sistemici sviluppati intorno al 1990 e posti in commercio a partire dal 1991. Tra i neonicotinoidi più importanti vi sono l'1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolin-2-ilideneammina (imidacloprid), insetticida sistemico che agisce per contatto o ingestione sugli insetti succhiatori, morsicatori e del suolo, e l'acetamiprid, con struttura e attività molto simile. Altri neonicotinoidi sistemici a largo spettro di azione sono thiacloprid, thiametoxam, nitenpyram e clothianidin, gli ultimi tre a bassissima tossicità per i mammiferi. L'uso dei neonicotinoidi è stato recentemente limitato in alcuni paesi europei a causa della loro presunta connessione con la malattia del declino catastrofico delle colonie di api ("honey-bee colony collapse disorder", CCD) e della loro tossicità verso gli uccelli e gli invertebrati acquatici. Uno studio italiano pubblicato nel 2013 ha dimostrato che i neonicotinoidi interferiscono con il sistema immunitario delle api, rendendole sensibili a infezioni virali alle quali sono normalmente resistenti (Di Prisco et al., 2013). A seguito di questo e di altri studi la Commissione Europea il 24 maggio 2013 ha imposto restrizioni all'uso del clothianidin, imidacloprid e thiametoxam a partire dall'1 dicembre 2013 (Regolamento EU No 485/2013).

1.5.2 Insetticidi regolatori della crescita (IGR)

Oltre alle quattro categorie di insetticidi sopra citati esiste un gruppo di insetticidi regolatori della crescita (Insect Growth Regulators o IGR), definiti insetticidi "di terza generazione" da Carroll Williams nel 1967 per il loro particolare meccanismo di azione. Gli IGR sono infatti

molecole che interferiscono con il ciclo vitale degli insetti, in particolare con la crescita e lo sviluppo, provocandone la morte, e sono caratterizzati da bassissima tossicità nei confronti dei mammiferi. Molti IGR sono considerati a “basso rischio” da parte dell’Environmental Protection Agency per la loro azione mirata contro gli stadi giovanili di insetti nocivi e bassa tossicità contro gli organismi benefici o non-target. Al contrario degli insetticidi di prima e seconda generazione, gli IGR non sono neurotossici e quindi sono meno dannosi anche per gli operatori; sono quindi maggiormente compatibili con sistemi di agricoltura integrata con controllo biologico e durante il loro uso risulta più difficile che gli insetti sviluppino resistenza (Dhadialla et. al., 2005).

Un primo gruppo di IGR è stato identificato esaminando le anomalie presentate dagli insetti durante lo sviluppo e selezionando composti chimici che producevano gli stessi effetti. In seguito sono state esaminate le fasi dello sviluppo degli insetti che richiedevano ormoni specifici e sono stati progettati analoghi chimici di sintesi di questi ormoni. Gli IGR possono interferire con la muta, mantenendo l’insetto negli stadi giovanili e quindi impedendone la riproduzione e causandone la morte. La loro azione è più lenta di quella di altri insetticidi perché dipende dalla durata dello stadio bersaglio e dalla velocità di sviluppo dell’insetto. Alcuni IGR inducono anche la larva a smettere di alimentarsi. Attualmente vi sono cinque categorie di IGR disponibili in commercio (juvenoidi, benzoilfenilurea, diacilidrazine, triazine e tiadiazine), riconducibili a tre classi fondamentali, cioè analoghi di JH, inibitori della sintesi di chitina. La classe più importante è quella costituita dai juvenoidi. I juvenoidi, o analoghi dell’ormone giovanile (JH), sono caratterizzati da una struttura simile a quella degli ormoni giovanili prodotti naturalmente dagli insetti, come il JHIII. Tutti i sistemi degli insetti influenzati da JH sono potenziali bersagli per l’azione di un juvenoide. I primi juvenoidi identificati erano veri analoghi del JH e quindi risultavano instabili alla luce ultravioletta: questo ne limitava fortemente l’uso in campo. In seguito si scoprì che gli estratti di numerose piante avevano effetti simili a quelli degli analoghi di JH, ma la loro struttura era diversa e la loro stabilità era maggiore. Questi composti furono usati per progettare “mimetici” dell’ormone giovanile molto più efficaci e stabili. Uno dei primi IGR commercializzati è stato l’analogo dell’ormone giovanile kinoprene (enstar); il più noto juvenoide è attualmente l’etil-2-(4-fenossifenossi)etilcarbammato (fenoxycarb). I juvenoidi sono attualmente usati per il controllo degli stadi larvali delle zanzare e di altri ditteri, e contro coleotteri, blattodei e afanitteri. Gli IGR che imitano il JH inducono nelle larve una muta prematura in un altro stadio larvale, a causa dell’eccesso di ormone giovanile: questo evento “scardina” il meccanismo di sviluppo larvale, provocando la morte. I juvenoidi possono inoltre agire sulle uova, provocando sterilità o modificazioni della diapausa. Gli IGR che inibiscono la

produzione di JH inducono gli insetti a mutare prematuramente in un adulto disfunzionale e quelli che inibiscono la produzione di ecdisone causano la morte delle pupe interrompendo la trasformazione dei tessuti larvali in quelli adulti. Tuttavia questi ultimi IGR sono troppo selettivi, al punto da renderne non economica la commercializzazione. La seconda classe di IGR introdotta sul mercato è stata quella degli inibitori della sintesi della chitina, che impediscono la formazione di questo polisaccaride necessario per l'esoscheletro: questi IGR colpiscono l'insetto al momento della muta, che risulta incompleta e anormale, provocandone la morte. Gli inibitori della sintesi della chitina possono inoltre colpire le uova, impedendo il normale sviluppo embrionale. La loro modalità di azione è rapida ma poco selettiva: possono infatti colpire anche insetti e altri artropodi. I primi inibitori della sintesi della chitina immessi in commercio sono stati la N-ciclopropil-1,3,5-triazina-2,4,6-triamminociromazina (ciromazina) e l'1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzil)urea (diflubenzuron), ai quali nel 2002 si sono aggiunti il novaluron e il buprofezin (Yu, 2008).

1.5.3 Il fenomeno della resistenza

Il fenomeno della “resistenza” agli insetticidi consiste in un cambiamento genetico, in risposta alla selezione esercitata dai principi attivi, che porta ad una perdita di efficacia in campo. La resistenza è quindi un fenomeno evolutivo legato alla presenza nell'ambiente degli insetticidi ed è fonte di gravi preoccupazioni perché la sua incidenza continua ad aumentare. Si ritiene che oggi vi siano più di 500 specie di insetti e acari che hanno sviluppato resistenza ad uno o più insetticidi. Le perdite economiche provocate da questo fenomeno sono tali da ritenere che la resistenza agli insetticidi sia uno dei problemi più gravi riguardanti non solo la produzione agricola, ma anche la salute umana ed animale. La maggioranza delle specie che ha sviluppato resistenza (56.1 %) è infatti di interesse agronomico, ma una buona parte delle restanti specie (39.3 %) è costituita da insetti di notevole interesse medico e veterinario, come ad esempio i ditteri. Sembra che per ora sia bassa la percentuale delle specie di insetti benefici (predatori, parassiti e impollinatori) che hanno sviluppato resistenza (4.6 %) (Yu, 2008).

1.5.4 Controllo di *M. domestica*

Un controllo duraturo delle infestazioni di *M. domestica* in ambito urbano o rurale presuppone in primo luogo una lotta gestionale e sanitaria, cioè una attività di risanamento ambientale comprendente la pulizia delle strade e dei cassonetti delle immondizie, adeguata attenzione nello smaltimento dei rifiuti urbani, ed inoltre una corretta gestione del letame negli allevamenti e nella concimazione dei campi (Pampiglione e Romi, 2012). Sono inoltre molto importanti sistemi fisici e meccanici quali zanzariere alle finestre, flussi di aria presso le entrate, lampade a cattura (invischiamento o elettrocuzione) e lampade UV-A. L'obiettivo

principale di queste pratiche è di eliminare o almeno ridurre al massimo i focolai larvali: gli interventi di lotta chimica devono essere effettuati esclusivamente come integrazione delle misure sanitarie, poiché *M. domestica* ha una forte tendenza a sviluppare resistenza. In ambito zootecnico, oltre al mantenimento di buoni standard di igiene sia negli ambienti di ricovero degli animali sia negli ambienti di lavorazione, è fondamentale la cura dei letami, con eliminazione dei ristagni idrici e incentivazione allo sviluppo delle specie di imenotteri (Pteromalidae) parassitoidi o predatori (Axtell, 1986; Pampiglione e Romi, 2012).

La lotta chimica contro *M. domestica* è effettuata contro le larve e contro gli adulti, impiegando nel primo caso prevalentemente IGR e nel secondo caso adulticidi a base di organofosfati, carbammati e piretroidi. Le regole generali sono di intervenire solo in casi di assoluta necessità, non impiegare mai gli stessi principi attivi per le larve e per gli adulti, eseguire trattamenti mirati e sugli stadi maggiormente vulnerabili, e soprattutto non miscelare mai insetticidi diversi per aumentare la presunta carica “abbattente”, perché in questo modo si favorisce l’insorgenza di pericolosi fenomeni di resistenza crociata (Pampiglione e Romi, 2012). Tra gli IGR usati come larvicidi, i più comuni sono il diflubenzuron, il piriproxifen e il triflumuron, sotto forma di polveri bagnabili, concentrati emulsionabili e granulati. Un altro IGR comunemente impiegato come larvicida contro *M. domestica* è la ciromazina (derivato propilico della melammina registrato nel 1984), a causa della sua azione specie-specifica e poco tossica nei confronti degli insetti utili e dei mammiferi (Giangaspero, 1997; Alam e Motoyama, 2000; Di Domenico et al., 2005). L’uso degli organofosfati e dei piretroidi come larvicidi è fortemente sconsigliato a causa del rapido sviluppo di resistenza e dell’elevato impatto ambientale. Gli adulticidi più frequentemente usati sono gli organofosfati, seguiti dai carbammati e dai piretroidi: sono formulati generalmente come polveri bagnabili o concentrati emulsionabili con cui si effettuano trattamenti murali ad azione residua sulle pareti dei fabbricati che costituiscono ricovero per gli adulti. Gli effetti di questi trattamenti si prolungano da due settimane a due mesi, in dipendenza dalla formulazione, dall’umidità, dall’esposizione alla luce solare e da altri fattori ambientali. I piretroidi sono principalmente impiegati come adulticidi sotto forma di aerosol per trattamenti spaziali esterni (in condizioni di emergenza e solo durante le ore più calde della giornata) o interni (al tramonto). In ogni caso i trattamenti con organofosfati e piretroidi non devono in alcun modo interessare gli animali, i mangimi e i prodotti derivati. Un modo molto più efficace di somministrare adulticidi e contemporaneamente limitare l’insorgenza di fenomeni di resistenza è quello di usare esche zuccherine contenenti imidacloprid e spinosad, con feromoni attrattivi, oppure con trappole cromotropiche o luminose. Le esche non devono mai essere sparse nell’ambiente ma poste in appositi contenitori, per evitare il contatto con animali non-target. In ambienti

zootecnici e in magazzini commerciali sono utili anche le strisce impregnate collanti, con zucchero come attrattivo e un basso contenuto in insetticidi poco tossici, come il propoxur, per evitare effetti repellenti (Pampiglione e Romi, 2012).

1.5.5 Diofenolan

Il diofenolan (CAS n. 63837-33-2) è una miscela dei diastereoisomeri (2RS, 4SR)- 4-(2-etil-1,3-diossolan- 4ilmetossi) fenil feniletere (50% - 80%) e (2RS, 4RS)- 4-(2-etil- 1,3-diossolan- 4-ilmetossi) fenil feniletere (50%-20%). E' detto anche (2S, 4R)- 2-etil- 4-[(4-fenossifenossi) metil]- 1,3-diossolan ed ha formula $C_{18}H_{20}O_4$ e peso molecolare 300.35 (Fig. 1.6).

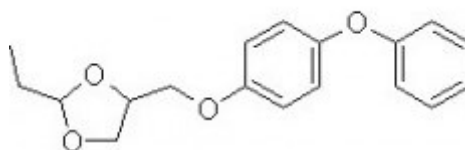


Fig. 1.6. Struttura molecolare del diofenolan
(CAS n. 63837-33-2).

E' un insetticida juvenoide appartenente alla categoria degli inibitori della crescita (IGR). Come mimetico dell'ormone giovanile ed inibitore della muta, è un IGR fotostabile usato sotto forma di concentrato emulsionabile per il controllo di cocciniglie, lepidotteri, blattodei e afanitteri (Streibert et al., 1994; Pedigo 2002; Singh e Kumar, 2011). Il suo impiego più comune è tuttavia contro cocciniglie e lepidotteri, nei quali agisce per ingestione: nelle cocciniglie inibisce lo sviluppo delle larve di I e II stadio e nei lepidotteri impedisce la maturazione di uova e larve. Il prodotto è efficace contro le larve appena schiuse, ma induce anche la produzione di uova non vitali negli adulti: infatti per il controllo dei lepidotteri il momento ottimale per l'applicazione è l'ovideposizione. In campo, il diofenolan si lega fortemente alle particelle solide del terreno e il suo tempo di dimezzamento è di circa tre giorni: ha quindi bassa probabilità di percolare fino alla falda acquifera. La modalità di azione e la buona selettività, unite al buon profilo tossicologico ed ecotossicologico, rende questo juvenoide particolarmente utile per la lotta biologica integrata (Integrated Pest Management) (Yu, 2008). Non è documentato il suo impiego commerciale contro *M. domestica*.

Questo studio si propone di valutare gli effetti del diofenolan su *M. domestica*, per un suo possibile uso contro questo insetto di rilevante interesse medico e veterinario. In questo campo gli unici lavori menzionati in letteratura sono quelli di Ghoneim et al. (2004) e Amer et al. (2006), pubblicati su una rivista interna dell'Università Al-Azhar (Il Cairo, Egitto) e solamente il primo è stato citato in un lavoro più recente degli stessi autori (Bakr et al., 2008).

Nessuno dei due lavori è risultato reperibile in rete o tramite servizi interbibliotecari internazionali, né alcun riassunto è risultato disponibile in inglese o in altre lingue. In un altro lavoro dello stesso gruppo di ricerca sul punteruolo rosso della palma, *Rhynchophorus ferrugineus* (Ghoneim et al., 2007b) il diofenolan è erroneamente indicato come “inibitore della sintesi della chitina”.

Nessun altro dato è attualmente disponibile sugli effetti del diofenolan su *M. domestica*.

2. SCOPO

Musca domestica rappresenta l'infestante sinantropo per eccellenza delle abitazioni (Süss, 2004), molto diffuso negli allevamenti (Birkemoe e Sverdrup-Thygeson, 2011) e principale infestante delle aziende avicole (Axtell, 1986). Insieme ai Calliphoridae e ai Sarcophagidae è il dittero più abbondante nelle discariche di rifiuti (Howard, 2001).

M. domestica ha un comportamento polifago, è caratterizzata da un'estrema capacità di spostamento e determina non solo problemi di infestazioni nei contesti zootecnici o nelle discariche, ma anche nelle zone residenziali limitrofe, con conseguenti rimostranze che giungono fino a procedimenti giudiziari nei confronti di proprietari e gestori degli impianti, accusati di generare l'infestazione (Axtell, 1986; Gerry et al., 2011; Pampiglione e Romi, 2012). Nei contesti zootecnici le infestazioni muscidiche possono causare ingenti perdite economiche, per danni diretti ed indiretti (Learmount et al., 2002). Infine, ma non meno importante, in contesti sociali con precarie condizioni igienico-sanitarie queste infestazioni esercitano un ruolo patogeno sia allo stadio larvale sia allo stadio adulto (Moon, 2009): lo stadio larvale può provocare miasi, mentre lo stadio adulto rappresenta una seria minaccia per la salute umana ed animale poiché è vettore meccanico di una ampia gamma di patogeni (Thaddeus et al., 2001).

Dalla fine degli anni '40 il controllo degli artropodi infestanti, compresa *M. domestica*, è stato effettuato con insetticidi di seconda generazione (cloroderivati, fosfororganici, carbammati e piretroidi) di origine sintetica e che esercitavano una attività neurotossica (Stenersen, 2004). Nonostante l'apparente efficacia, negli anni queste molecole hanno iniziato a manifestare problematiche molto gravi, legate in particolare alla loro bassissima selettività verso gli insetti target, all'elevata tossicità nei confronti dei vertebrati (dovuta alle somiglianze nel funzionamento tra il loro sistema nervoso e quello degli artropodi) e all'elevata liposolubilità, che ha determinato fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione (Yu, 2008). Inoltre l'impiego di queste molecole in maniera non corretta ha determinato a lungo termine la comparsa di fenomeni di resistenza che, nel caso di *M. domestica*, rappresentano attualmente una problematica su scala globale (Scott et al. 2000, Kaufman et al. 2001, Marçon et al. 2003, Khan et al. 2013). Per queste ragioni negli anni '60 e '70 la ricerca si è indirizzata verso la sintesi di nuove molecole, aprendo il campo alla terza generazione d'insetticidi, i "regolatori della crescita" (Insect Growth Regulators, IGR, in italiano IRC). Queste nuove molecole hanno tre caratteristiche fondamentali: agiscono sui sistemi fisiologici e biochimici degli artropodi, hanno un'elevata tossicità specie-specifica e il loro impiego non determina gravi effetti negativi sull'ambiente (Dhadialla et al., 2005).

L'attività degli IGR si esplica soprattutto sugli stadi immaturi (hanno quindi azione larvicida), ma alcuni di questi insetticidi hanno anche azione sterilizzante sugli adulti (Thomas e Jespersen, 1984; Howard e Wall, 1996; Sun e Barrett, 1999; Alam e Motoyama, 2000). Precedenti ricerche condotte su *M. domestica* hanno dimostrato che gli adulti trattati con IGR presentano anomalie nella fecondità e nella fertilità, traducibili in un calo nella deposizione e nella schiusa delle uova, quindi in sterilità (Kawada et al., 1992). Data l'efficacia e la bassa tossicità ambientale degli IGR, questa tesi di dottorato ha voluto approfondire lo studio degli effetti in *M. domestica* di un insetticida regolatore della crescita, il diofenolan, un analogo dell'ormone giovanile, non ancora registrato per il controllo di questa specie in Italia.

In particolare questo studio si è proposto i seguenti obiettivi:

- valutare la tossicità del diofenolan sugli stadi immaturi;
- identificare a livello morfologico ed ultrastrutturale gli effetti del trattamento con diofenolan sugli stadi immaturi;
- valutare gli effetti del principio attivo sulla capacità riproduttiva delle femmine;
- individuare eventuali alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali indotte dal diofenolan a carico dell'apparato riproduttore femminile;
- valutare le possibili interferenze (e/o interazioni) dell'attività del diofenolan con quella degli ecdisteroidi, direttamente coinvolti nello sviluppo ovarico nell'adulto;
- valutare a livello morfologico ed ultrastrutturale le possibili interazioni con l'attività dei corpora allata.

Questo studio vuole quindi fornire un essenziale supporto conoscitivo sull'attività di questo insetticida nei confronti di *M. domestica* ed è finalizzato a successive ricerche applicative da effettuare in campo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppo utilizzato

Nella sperimentazione è stato utilizzato il ceppo di *Musca domestica* L. fornito dalla ditta Ruggeri & C. (Crespellano, Bologna, Italy), a sua volta proveniente da un ceppo sensibile (SRS/WHO - Standard Reference Strain/World Health Organization) (Di Domenico et al., 2005), mantenuto dal 2009 presso il Laboratorio di Ecologia Applicata all'Ambiente Terrestre del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotechnologie dell'Università di Ferrara. Il ceppo, di seguito indicato come s-DBF (sensibile), è caratterizzato dal fatto di non avere mai subito alcun tipo di trattamento insetticida.

3.2 Allevamento del ceppo

L'allevamento del ceppo sensibile è stato suddiviso in 2 fasi, ognuna delle quali prevede differenti tipologie di stabulazione, una per l'accoppiamento e la produzione continua di uova e una per lo sviluppo degli stadi immaturi e degli adulti.

Per un corretto ed efficiente sviluppo larvale le uova sono state deposte in contenitori di plastica per alimenti ("box") contenenti un pabulum ottenuto miscelando latte, lievito di birra, crusca e croccantini per gatti in idonee proporzioni. Questa tipologia di substrato garantisce tutti i nutrienti essenziali per una corretta crescita degli stadi immaturi. A sfarfallamento avvenuto i giovani adulti sono prelevati e messi in box per l'ovideposizione, ciascuno corredato da tre piccoli contenitori in plastica da 30 ml, di cui uno contenente zucchero in zollette per assicurare un'idonea risorsa trofica agli adulti, e altri due riempiti con cotone imbevuto di latte, nei quali sono deposte le uova. Tutte le fasi di sviluppo avvengono all'interno di una cella termostata (ISCO s.r.l., Milano, Italia) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ umidità relativa (UR) e fotoperiodo 12:12 luce:buio. Queste condizioni di stabulazione consentono una disponibilità continua di mosche per la sperimentazione (Pezzi et al., 2011).

3.3 Principio attivo utilizzato nei biosaggi

Il principio attivo utilizzato nei biosaggi effettuati mediante applicazione topiche è il diofenolan allo stato di prodotto tecnico (Pestanal[®], Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, 250 mg, CAS Number: 63837-33-2, codice 31668, purezza 98.5%). Dopo avere verificato tramite test preliminari eventuali effetti tossici indotti dal solvente, il principio attivo è stato disciolto in 99% acetone (Sigma-Aldrich). Per i trattamenti topici sulle larve le dosi di principio attivo impiegate sono state le seguenti: 0.78 µg/µl, 1.56 µg/µl, 3.12 µg/µl, 6.25 µg/µl, 12.5 µg/µl, 25 µg/µl e 50 µg/µl, mentre per le femmine adulte sono state: 5 µg/µl, 25 µg/µl, 50 µg/µl e 75

µg/µl. Ad ogni larva o adulto è stato somministrato 1 µl di soluzione del principio attivo alle varie dosi. Opportuni controlli sono stati allestiti somministrando 1 µl di acetone puro ad ogni larva o adulto. A meno di diversa indicazione, tutti i reagenti impiegati negli esperimenti erano di grado analitico e forniti da Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri (USA).

3.4 Valutazione della tossicità al diofenolan negli stadi immaturi

Per valutare la tossicità del diofenolan negli stadi immaturi è stata applicata la tecnica del trattamento topico su larve entrate al terzo stadio da un minimo di un'ora ad un massimo di tre ore. Le applicazioni topiche sono state effettuate mediante l'uso di un microapplicatore Hamilton (Hamilton, Bonaduz, Svizzera) su cui è stata montata una siringa Kloehn (Norgren Kloehn Inc., Las Vegas, Nevada, USA) da 50 µl (Fig. 3.1A).

Ad ogni larva sottoposta al test era somministrato per via topica 1 µl di insetticida alle diluizioni precedentemente indicate (vedi paragrafo 3.3). Per facilitare l'operazione di trattamento, prima della somministrazione le larve erano posizionate singolarmente in appositi piccoli contenitori nei quali il microapplicatore poteva facilmente e rapidamente ricoprire la larva con la dose in esame, senza alcun trauma (Fig. 3.1B-D).

Per ognuna delle 7 diluizioni indicate sono state effettuate tre repliche di 30 individui ciascuna e tre controlli, costituiti da 30 individui trattati con acetone puro. I piccoli contenitori con gli individui trattati e di controllo erano fissati su appositi sostegni. Dopo il trattamento si attendevano 15 minuti per permettere l'evaporazione del solvente e le larve erano quindi trasferite in contenitori da 200 ml (Anicrin, Padova, Italia) in cui erano stati collocati 100 g di un opportuno pabulum (adatto al terzo stadio larvale). Sul coperchio sagomato di ogni contenitore era posizionata una retina per consentire l'aerazione e impedire la fuga (Fig. 3.1E, F). Tutti i contenitori sono stati mantenuti in cella termostata, alle condizioni precedentemente indicate nel paragrafo 3.2. Per la raccolta dei dati di mortalità, si consideravano deceduti gli esemplari che non mostravano attività motoria allo stadio larvale, gli esemplari incapaci di sfarfallare completamente e gli esemplari che, a sei giorni dalla pupazione, non mostravano segni di sfarfallamento. Tutti i dati raccolti sono stati successivamente elaborati con il programma POLO-PC (LeOraSoftware, 1987) che fornisce i parametri della retta che esprime la relazione esistente tra dose impiegata (µg/µl) e mortalità ottenuta. I dati acquisiti dai trattamenti su *M. domestica* sono stati quindi trasformati in valori logaritmici (dose, variabile x) e la mortalità in probits (variabile y). Il programma consente l'immissione dei dati di mortalità e provvede ad applicare la formula di Abbott della mortalità corretta in base ad eventuali valori di mortalità registrati nei controlli (Abbott, 1925) :

$$\text{mortalità corretta} = \frac{n. \text{morti dose} - n. \text{morti del controllo}}{100 - n. \text{morti del controllo}} \times 100$$

In base a questi dati il programma fornisce in output i principali parametri di una retta (equazione, intercetta e pendenza) che è ottenuta graficamente tramite il programma Windows Office Excel, version 2010. Il software POLO-PC fornisce inoltre i due principali parametri tossicologici in termini di dosi letali (DL), la DL_{50} e la DL_{90} relativa al principio attivo. Queste sono le dosi che causano rispettivamente una mortalità del 50% e del 90% nella popolazione sottoposta alla prova e i loro relativi intervalli di confidenza al 95%, che saranno di seguito indicati come IC 95%.

3.5 Analisi morfologica delle larve e dei pupari

Parallelamente alla valutazione della tossicità del diofenolan mediante trattamenti topici, alcuni esemplari deceduti in seguito al trattamento sono stati sottoposti ad una analisi morfologica macroscopica e ad una analisi ultrastrutturale della superficie del corpo mediante microscopia elettronica a scansione. In particolare sono stati esaminati gli esemplari non del tutto sfarfallati e quelli che non manifestavano segni di sfarfallamento.

In base ai risultati ottenuti nella prima serie di indagini, sono state inoltre verificate le alterazioni morfologiche macroscopiche e ultrastrutturali della superficie del corpo di 10 larve appositamente trattate, come indicato nel paragrafo 3.4, con una dose di principio attivo pari alla DL_{90} , effettuando le osservazioni dopo 48 ore dal trattamento. Come controllo, altre 10 larve sono state trattate con solo acetone, come indicato nel paragrafo 3.4. Tra queste 10 larve, 5 sono state esaminate a 48 ore dal trattamento (prima di impuparsi) mentre le restanti 5 sono state esaminate allo stadio pupale. L'analisi morfologica macroscopica è stata eseguita tramite uno stereomicroscopio Nikon SMZ 800 (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Olanda) collegato ad una fotocamera Nikon Digital Sight Ds-Fi1 (Nikon Instruments Europe) che consentiva l'acquisizione delle immagini.

L'analisi ultrastrutturale della superficie del corpo nelle larve e nelle pupe tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) è stata eseguita dopo una serie di passaggi di seguito descritti:

- fissazione in glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato di sodio (sodio dimetilarsinato) 0.125 M, pH 7.3, per 72 ore;
- quattro lavaggi da 10 minuti ciascuno in tampone cacodilato di sodio 0.125 M, pH 7.3;
- post-fissazione con 1% tetrossido di osmio in tampone cacodilato di sodio 0.125 M, pH 7.3;
- quattro lavaggi da 10 minuti ciascuno con tampone cacodilato di sodio 0.125 M, pH 7.3;
- disidrazione in 5 diluizioni crescenti di alcool etilico (alcool 70°, alcool 80°, alcool 90°, alcool 95°, alcool 100°), effettuando tre passaggi da 15 minuti ciascuno in ogni soluzione .

I passaggi in alcool sono stati seguiti da altri tre passaggi da 3 minuti ciascuno rispettivamente in una soluzione contenente alcool 100° + ossido di propilene 1:1 e una con ossido di propilene puro ACS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA).

I campioni sono stati montati su appositi supporti (“stub”) e metallizzati con oro-palladio mediante un apparecchio Sputter Coated S150 Edwards (HHV Ltd, Crawley, Regno Unito).

La metallizzazione e l’osservazione dei campioni è stata eseguita presso il Centro di Microscopia Elettronica dell’Università di Ferrara. Le osservazioni sono state eseguite in modalità “alto vuoto” con il microscopio a scansione Zeiss EVO 40 (Zeiss, Milano, Italia).

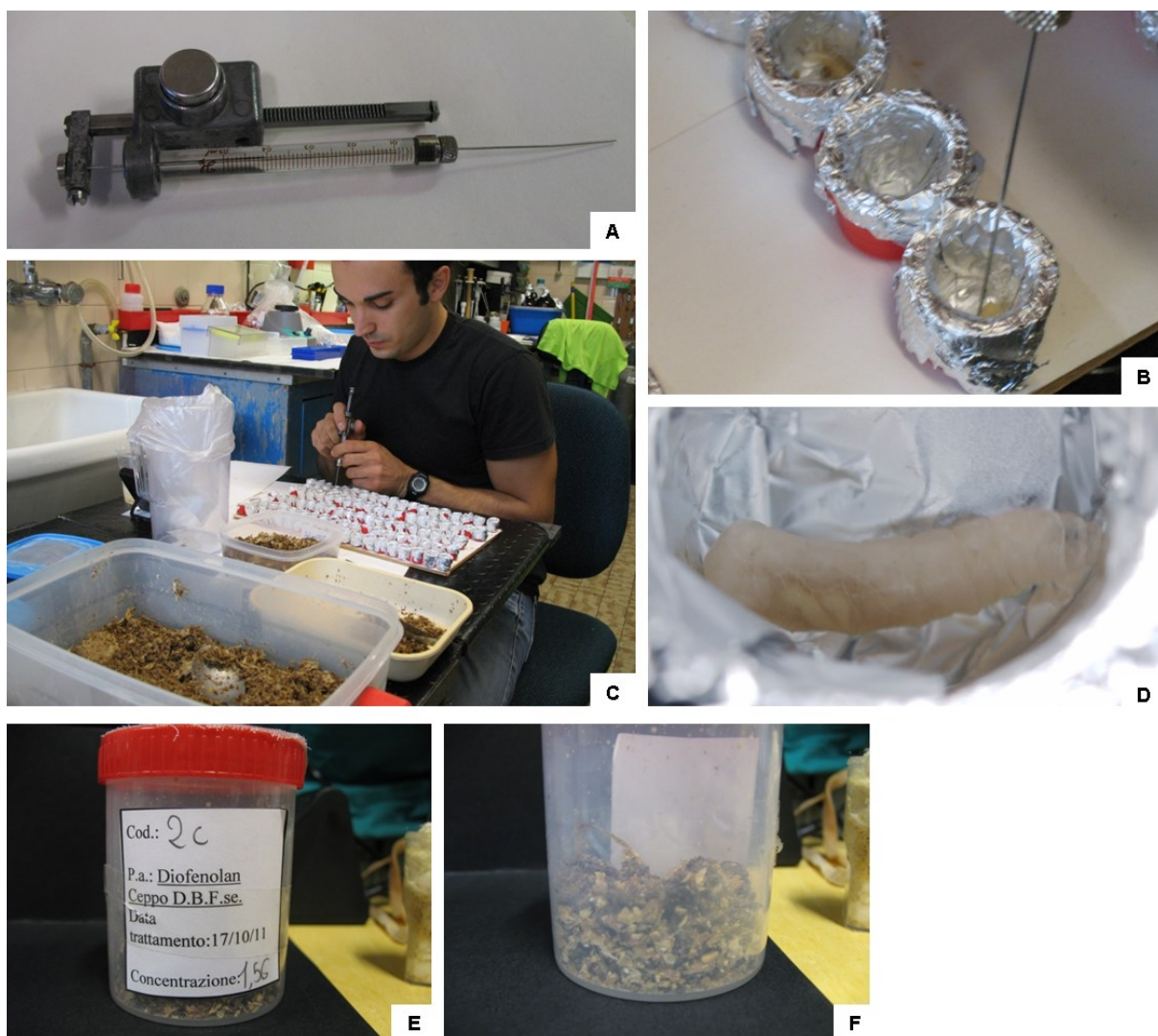


Fig. 3.1. Test topici sulle larve. [A] Microapplicatore. [B] [C] Trattamento topico. [D] Dettaglio della larva all’interno di un box di trattamento. [E] [F] Box dove sono state alloggiate le larve dopo il trattamento.

3.6 Indagini sull'apparato riproduttore femminile

3.6.1 Test di fecondità

I test di fecondità sono stati svolti per valutare se il principio attivo in esame fosse in grado di influenzare il numero di uova deposte (Ghoneim et al., 2007a). Per fecondità negli insetti si intende infatti il numero medio di uova deposte in un determinato tempo (in questo caso il numero medio di uova deposte in 10 giorni). Per avere a disposizione un numero idoneo di femmine vergini, si è reso necessario inserire singolarmente un numero notevole di individui (tra 400 e 600) allo stadio pupale in appositi contenitori chiusi con un velo ("tubi di sfarfallamento") (Fig. 3.2A-D). Una volta sfarfallati, gli individui erano sessati visivamente sulla base della morfologia dei genitali esterni (Fig. 3.2E-G) e le femmine coeve, precedentemente sedate con CO₂ e aliquotate in gruppi di 10, erano trasferite per 15 ore in contenitori provvisti di un sistema di alimentazione ed idratazione. Trascorso questo tempo, il contenitore era posto a freddo per 90 secondi per rallentare l'attività degli insetti e le femmine erano trattate topicamente tramite un microapplicatore Hamilton (Fig. 3.2H, inserto), come descritto nel paragrafo 3.4, ed infine trasferite in appositi box (Fig. 3.3A-C). I maschi coevi alle femmine, precedentemente selezionati e sedati a freddo in gruppi di 10, erano infine aggiunti al box. I box erano allestiti in modo tale da consentire sia l'approvvigionamento dell'alimento da parte degli adulti sia la deposizione delle uova. L'alimentazione era resa possibile per la presenza di due provette in plastica da 50 ml (Fig. 3.3A, sinistra), sagomate ed opportunamente corredate di cotone imbibito con una miscela di latte 90% e zucchero 10%, la cui sommità era chiusa con carta da filtro tenuta *in situ* da un anello di plastica (Fig. 3.3A, destra). Le due provette erano fissate al box con un particolare sistema di bloccaggio (Fig. 3.3B) e erano cambiate ogni 24 ore, prelevando le uova deposte dopo aver anestetizzato con CO₂ le mosche per evitare la loro fuga. Gli adulti erano mantenuti in questi box per 10 giorni. I biosaggi per la valutazione della fecondità sono stati effettuati utilizzando le seguenti 4 dosi di principio attivo: 5 µg/µl, 25 µg/µl, 50 µg/µl e 75 µg/µl. Per ogni dose sono state allestite 4 repliche con 10 maschi e 10 femmine della stessa età. Per ogni dose è stato inoltre allestito un idoneo controllo costituito da 4 repliche con 10 maschi e 10 femmine, della stessa età dei trattati, a cui era somministrato topicamente 1 µl di acetone puro. Le uova deposte sono state contate e sui valori ottenuti sono stati effettuati i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov per verificare la normalità (o distribuzione normale) e l'omoschedasticità (o dispersione omogenea) dei dati. In seguito, per verificare se vi erano differenze significative tra il numero medio di uova deposte dalle femmine trattate e il numero medio di uova deposte dalle femmine di controllo, è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA a una via a confronti

pianificati con il programma STATISTICA 7.1 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA), selezionando il livello di significatività $p < 0.05$.

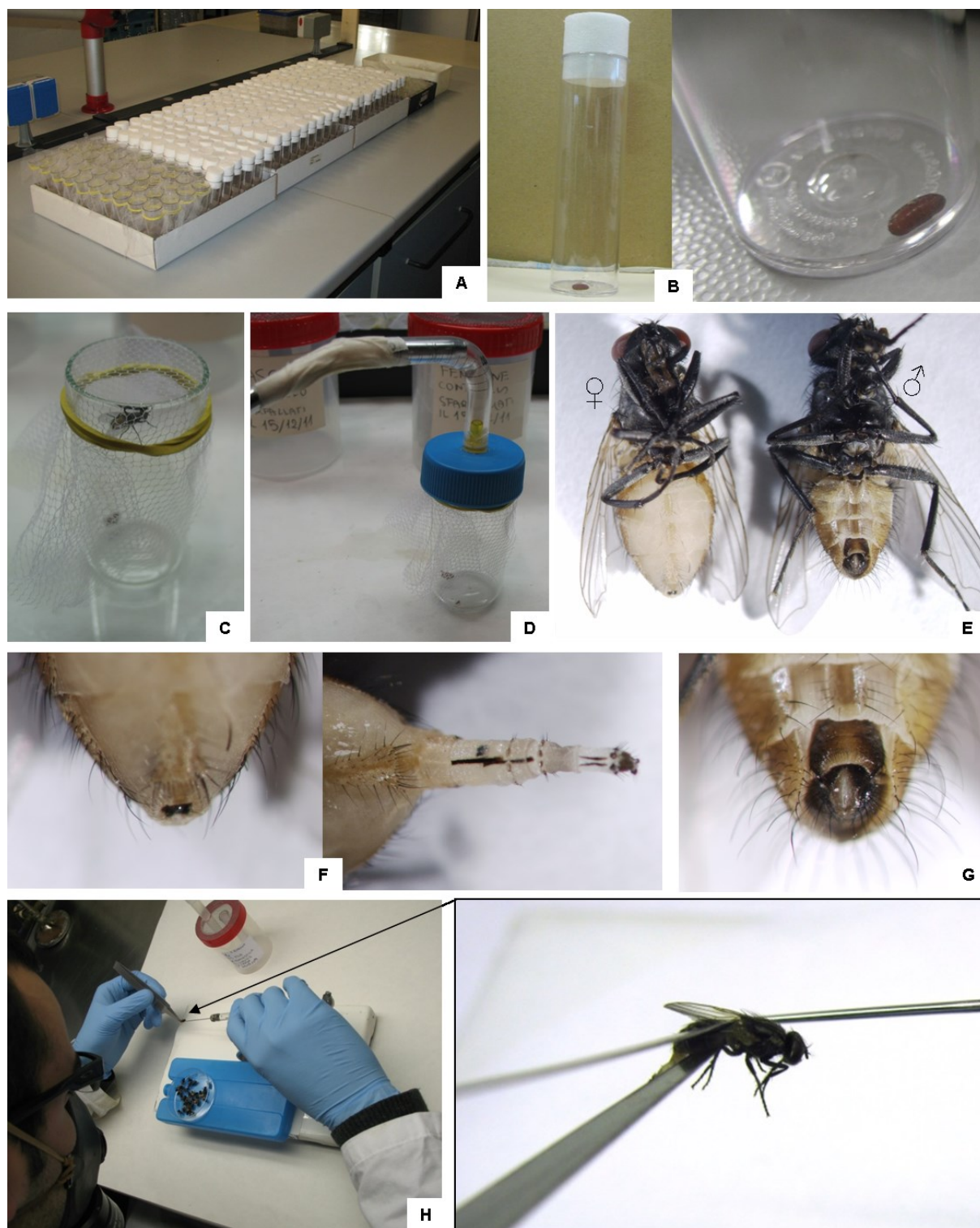


Fig. 3.2. Sfarfallamento e trattamento topico. [A] Tubi di sfarfallamento. [B] Dettaglio di un tubo di sfarfallamento contenente una pupa. [C] Dettaglio di un tubo di sfarfallamento contenente un esemplare sfarfallato. [D] Riduzione dell'attività vitale della mosca adulta tramite applicazione di CO_2 . [E] Adulto di sesso femminile e adulto di sesso maschile. [F] Genitali esterni femminili con ovopositore retratto (a sinistra) e ovopositore disteso (a destra). [G] Genitali esterni maschili (ipopigio). [H] Trattamento topico; l'inserito mostra una mosca durante l'operazione di trattamento topico.

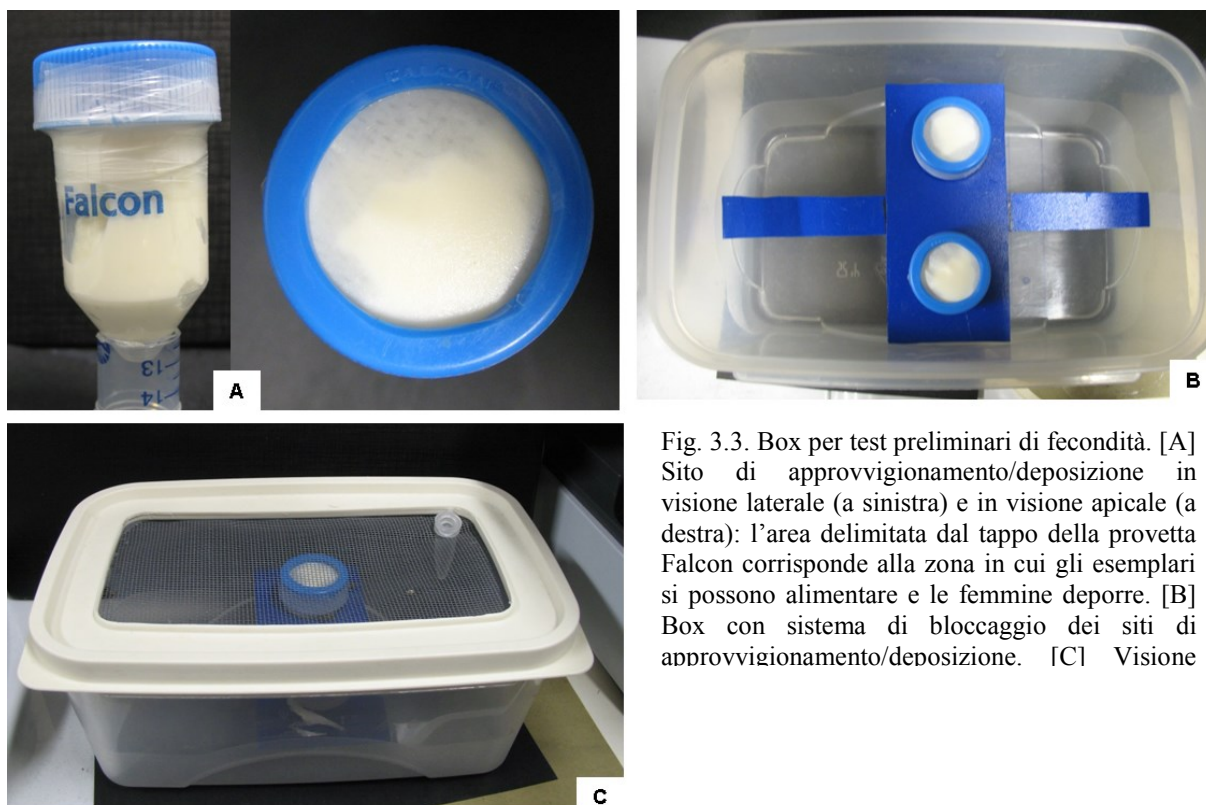


Fig. 3.3. Box per test preliminari di fecondità. [A] Sito di approvvigionamento/deposizione in visione laterale (a sinistra) e in visione apicale (a destra): l'area delimitata dal tappo della provetta Falcon corrisponde alla zona in cui gli esemplari si possono alimentare e le femmine deporre. [B] Box con sistema di bloccaggio dei siti di approvvigionamento/deposizione. [C] Visione

3.6.2 Osservazioni allo stereomicroscopio

Una volta riscontrate differenze significative tra il numero medio di uova deposte dalle femmine trattate e quello medio delle femmine di controllo, si è proceduto all'analisi ed all'osservazione degli ovai allo stereomicroscopio. Gli adulti di entrambi i sessi sono stati raccolti e preparati secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6.1, e le femmine sono state trattate con la dose di $75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, che negli esperimenti precedenti aveva dimostrato il maggiore effetto inibente sulla ovideposizione. Le femmine trattate e quelle di controllo sono state mantenute nei box in presenza dei maschi fino a 90 ore dallo sfarfallamento, cioè a poche ore dal primo ciclo gonotrofico, con ampia disponibilità di cibo e idratazione. Dopo 90 ore dallo sfarfallamento, tutti gli adulti sono stati anestetizzati con CO_2 e sacrificati immediatamente senza traumi. Le femmine sono state dissezionate e gli ovai espianati con l'aiuto di uno stereomicroscopio SZM-2 (Optika Microscopes, Bergamo, Italia) usando pinzette e microforbici per dissezione. La dissezione è stata eseguita all'interno di un vetrino da orologio ("watch glass") contenente fissativo (formaldeide al 4%, pH 6.9, Carlo Erba, Milano, Italia), effettuando un'incisione nell'addome lungo la regione laterale dei tergiti. L'incisione permetteva di esporre gli ovai, che a questo punto potevano essere estratti agevolmente con una piccola spatola. Gli ovai estratti sono stati posti in fissativo (formaldeide al 4%, pH 6.9, Carlo Erba) per 4 ore, successivamente in tampone cacodilato di sodio 0.125 M (pH 7.3) addizionato a 6% saccarosio. Gli ovaroli sono stati leggermente separati ed osservati allo stereomicroscopio Nikon SMZ 800 (Nikon Instruments Europe),

fotografandoli tramite la fotocamera Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Nikon Instruments Europe) montata sullo stesso apparecchio. Questa procedura ha permesso di valutare l'eventuale presenza di alterazioni morfologiche macroscopiche.

3.6.3 Test di fecondità e di schiusa per ciclo gonotrofico

Per ottenere dati sull'effetto dell'insetticida sulla fecondità di *M. domestica* in ogni ciclo gonotrofico è stato necessario redigere un opportuno protocollo che prevedesse la valutazione della fecondità per singola femmina. A questo scopo sono stati progettati appositi box (dotati di idonea alimentazione e di un sito dove deporre le uova) nei quali inserire una singola femmina insieme ad un numero fisso (4) di maschi.

I box sono stati ottenuti tramite recipienti cilindrici di plastica da 200 ml (Anicrin, Verona, Italia), appositamente modificati e assemblati in modo da evitare la fuga degli animali (Fig. 3.4A). Per l'alimentazione e la deposizione sono state impiegate provette di plastica da 50 ml modificate come nei test di fecondità descritti nel paragrafo 3.6.1, ma dotate di un foro laterale che, tramite un tubicino di silicone, le metteva in collegamento con una siringa fissata alla parete del box e piena di una miscela composta da 70% latte e 30% acqua. Per il principio dei vasi comunicanti, questo sistema consentiva di mantenere il sito di deposizione umido e adatto alla sopravvivenza delle uova, che erano continuamente raccolte per verificare il loro numero totale e il numero di quelle schiuse (Fig. 3.4B-D).

Come nei test precedenti, per avere a disposizione femmine vergini le pupe erano poste singolarmente nei tubi di sfarfallamento e gli individui sfarfallati erano sessati. A 15 ore dallo sfarfallamento le femmine erano trattate topicamente con 75 µg/µl di principio attivo, con opportuni controlli. Una volta effettuato il trattamento, ogni singola femmina era posizionata in un box assieme a 4 maschi della stessa età. In totale sono stati allestiti 10 box per i trattati e 10 box per i controlli.

Ogni 3 ore la deposizione era controllata e, se necessario, era aggiunta la miscela di latte e acqua nella siringa per aumentare il grado di umidità del sito stesso. La verifica per la presenza di uova è stata effettuata ogni 3 ore, ininterrottamente, per la durata di tre cicli gonotrofici (pari a 8-10 giorni). Subito dopo la prima deposizione, ciascuna femmina in compagnia dei 4 maschi era anestetizzata con CO₂ e tutti gli individui erano trasferiti in un altro box, allestito nello stesso modo del primo per consentire alla femmina di portare a termine il secondo ciclo gonotrofico e quindi la seconda deposizione. Queste operazioni sono state ripetute fino al terzo ciclo gonotrofico.

Le uova deposte erano prelevate tramite un pennello a punta fine, contate e collocate in appositi contenitori per la verifica della schiusa. I contenitori erano costituiti da una piastra Petri in plastica, di diametro 6 cm, al cui interno era stato posizionato cotone idrofilo

ricoperto da un disco di carta da filtro. Il tutto era tenuto in posizione dal coperchio, appositamente forato e fissato con nastro adesivo. Per consentire un veloce posizionamento e conteggio delle uova schiuse, in ogni piastra erano fissati tre ritagli di rete di materiale plastico, costituito da 25 maglie di 1x2mm (Fig. 3.4E).. In ogni maglia era posizionato un uovo e, a 8-10 ore dal posizionamento, tramite lo stereomicroscopio erano effettuati i controlli e i conteggi delle schiuse (Fig. 3.4F) ed inoltre le microfotografie per documentare le eventuali anomalie, eseguite secondo la procedura indicata nel paragrafo 3.6.2.

Sui numeri ottenuti dai conteggi delle uova deposte sono stati effettuati i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov per verificare la normalità e l'omoschedasticità dei dati. In seguito, per verificare se vi erano differenze significative tra il numero medio di uova deposte dalle femmine trattate e il numero medio di uova deposte dalle femmine di controllo per ogni ciclo gonotrofico, è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA a una via a confronti pianificati con il programma STATISTICA 7.1, selezionando il livello di significatività $p < 0.05$.

I dati riguardanti i conteggi delle uova deposte per ogni ciclo gonotrofico sono inoltre impiegati per il calcolo dell'inibizione di fecondità ("fecundity inhibition") (Ghoneim et al., 2007a) espressa in percentuale secondo la formula:

$$\frac{A - a}{A} * 100$$

A: numero medio di uova deposte dal gruppo di controllo;

a: numero medio di uova deposte dal gruppo del trattato.

Per ogni ciclo gonotrofico è stata calcolata la percentuale di uova schiuse sul totale di uova deposte ed è stato inoltre calcolato l'indice di sterilità ("sterility index") (Ghoneim et al., 2007a) espresso in percentuale secondo la formula:

$$100 - \frac{a * b}{A * B} * 100$$

a: numero medio di uova deposte dal gruppo del trattato in un ciclo gonotrofico;

b: percentuale di uova schiuse deposte dal gruppo del trattato in un ciclo gonotrofico;

A: numero medio di uova deposte dal gruppo del controllo in un ciclo gonotrofico;

B: percentuale di uova schiuse deposte dal gruppo del controllo in un ciclo gonotrofico.

L'indice di sterilità consente di verificare l'influenza dell'insetticida sulla capacità procreativa delle femmine, mettendo in relazione la fecondità e la schiusa (Ghoneim et al., 2007a).

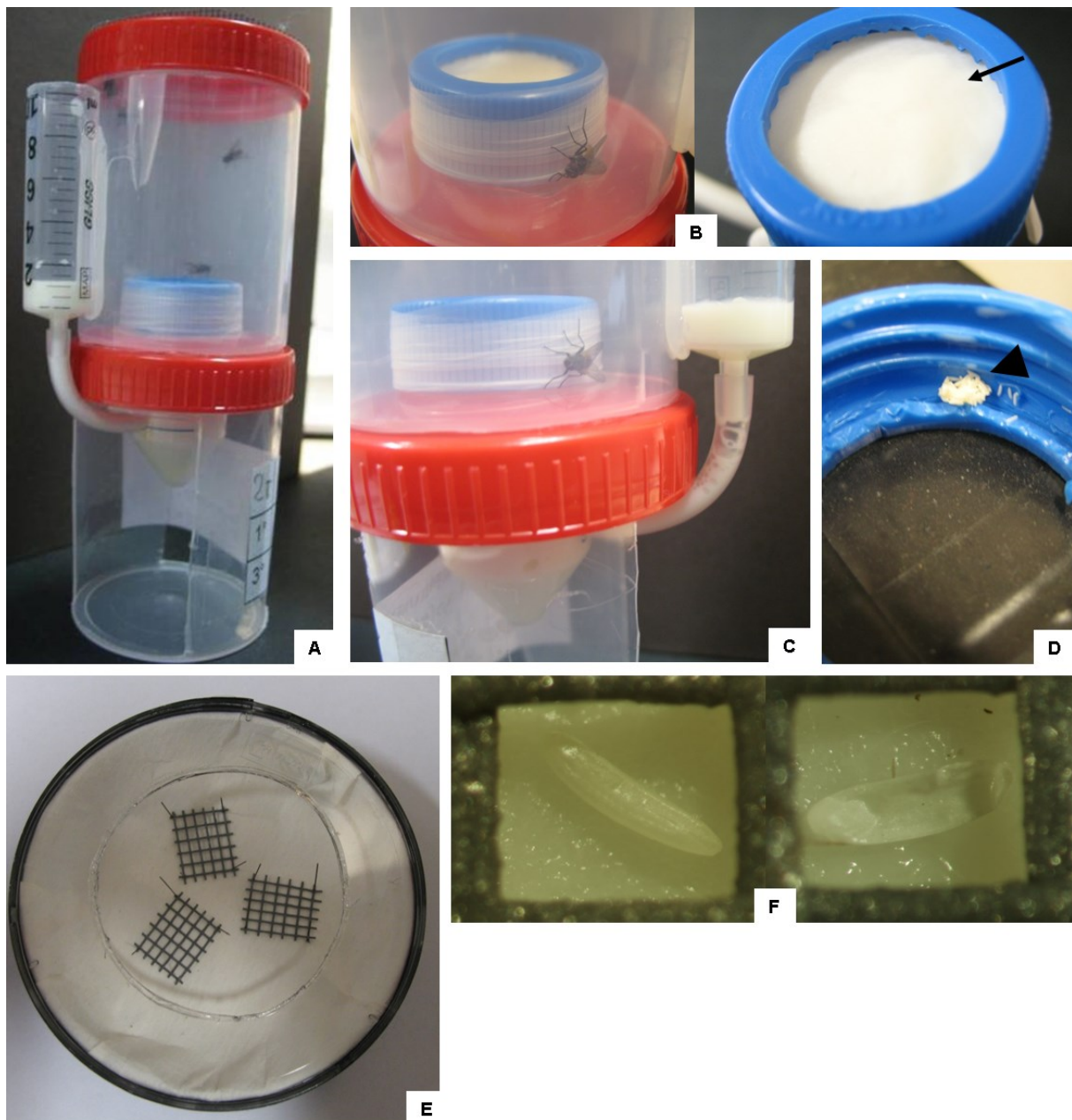


Fig. 3.4. Test di fecondità per ciclo gonotrofico. [A] Box per test di fecondità per ciclo gonotrofico; [B] Dettaglio del sito di approvvigionamento/deposizione. La freccia indica la zona di deposizione. [C] Dettaglio della zona di raccordo tra il sito di approvvigionamento/deposizione e la siringa “serbatoio”. [D] Uova deposte a livello del sito di approvvigionamento/deposizione. La freccia triangolare indica un gruppo di uova deposte. [E] Sito di schiusa con reticoli per facilitare il conteggio delle uova schiuse. [F] Uovo non schiuso (a sinistra), uovo schiuso (a destra).

3.6.4 Analisi degli ovarioli tramite microscopia ottica a fresco

Dopo avere verificato la presenza di alterazioni morfologiche macroscopiche a carico degli ovarioli nelle femmine trattate, le anomalie riscontrate sono state descritte classificandole per morfotipo. Con questo metodo è stato possibile ricostruire un quadro dettagliato delle dimensioni dei follicoli, delle loro componenti cellulari e delle relazioni che intercorrono tra gli elementi costituenti un singolo ovario (germario e vitellario). Per queste analisi sono state impiegate le stesse modalità di stabulazione adottate per il test di fecondità per ciclo gonotrofico (tipologia di box per l'alloggiamento degli adulti, dose e modalità di somministrazione) precedentemente menzionate nel paragrafo 3.6.3. In questa serie di esperimenti lo sfarfallamento è indicato come T0 e la somministrazione del principio attivo (o di acetone puro nei controlli) è indicata come T0P. Le femmine trattate e non trattate sono state quindi prelevate dai box a intervalli di tempo diversi, ovvero 30 ore (T1), 55 ore (T2) e 75 ore (T3), che corrispondono rispettivamente a 45, 70 e 90 ore dallo sfarfallamento (Fig. 3.5). Con le stesse modalità descritte nel paragrafo 3.6.2 gli ovari sono stati prelevati e trattati per la microscopia ottica a fresco. Gli ovarioli sono stati separati con fini strumenti da dissezione (pinzette e aghi manicati) per l'allestimento di vetrini. Tutti gli ovarioli sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Europe) e fotografati tramite una fotocamera Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Nikon Instruments Europe) montata sul microscopio. Le immagini acquisite sono state sottoposte a misure morfometriche tramite il software di analisi d'immagine NIS-Elements Documentation (Nikon Instruments Europe), misurando in particolare l'area delle principali componenti cellulari dei follicoli (area totale, area occupata dall'oocita e area occupata dalle cellule nutrici) (Fig. 3.6A). Con questa tecnica sono stati analizzati ed osservati tutti gli ovarioli di ogni ovario destro di ogni singola femmina, per un totale di 3 ovari esaminati per ciascun periodo T0 e T0P, e un totale di 3 ovari trattati e 3 di controllo per gli altri tre periodi (T1, T2 e T3). Sulle misure morfometriche sono stati effettuati i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov per verificare la normalità e l'omoschedasticità dei dati. In seguito, per verificare se vi erano differenze significative tra le misure morfometriche degli ovarioli trattati e degli ovarioli di controllo è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA a una via a confronti pianificati con il programma STATISTICA 7.1, selezionando il livello di significatività $p < 0.05$.

3.6.5 Mappatura degli ovari

In contemporanea alla descrizione delle alterazioni morfologiche e al conteggio degli ovarioli che compongono ogni singolo ovario, per il solo tempo T3 è stata registrata anche la posizione degli ovarioli all'interno dell'ovario, per verificare l'esistenza di correlazioni con i morfotipi descritti. È stato quindi necessario allestire un opportuno piano di lavoro di

diametro 2.5 cm, costituito da una piccola piastra Petri di vetro da 5 ml sul cui fondo è stata colata e raffreddata cera di colore nero. La piastra è stata poi riempita con 3 ml di tampone cacodilato 0.125 M e saccarosio 6%. L'ovario è stato bloccato con aghi entomologici n. 0.15, con la parte anteriore rivolta verso l'alto. L'operazione permetteva di asportare i singoli ovarioli mantenendo una certa integrità nella struttura ovarica e consentendo quindi la registrazione della posizione di ciascun ovario all'interno dell'organo (Fig. 3.6B, C).

Le operazioni di bloccaggio dell'ovario e di separazione degli ovarioli sono state effettuate tramite stereomicroscopio SZM-2 (Optika Microscopes, Bergamo, Italia). La posizione di ciascun ovario è stata rilevata tramite osservazione e i risultati sono stati mappati tramite una tavoletta grafica (Wacom Bamboo CTH670, Vancouver, Washington, USA) corredata dal software per elaborazione grafica ArtRage Studio Pro 3.5.5 (ArtRage, Auckland, Nuova Zelanda).

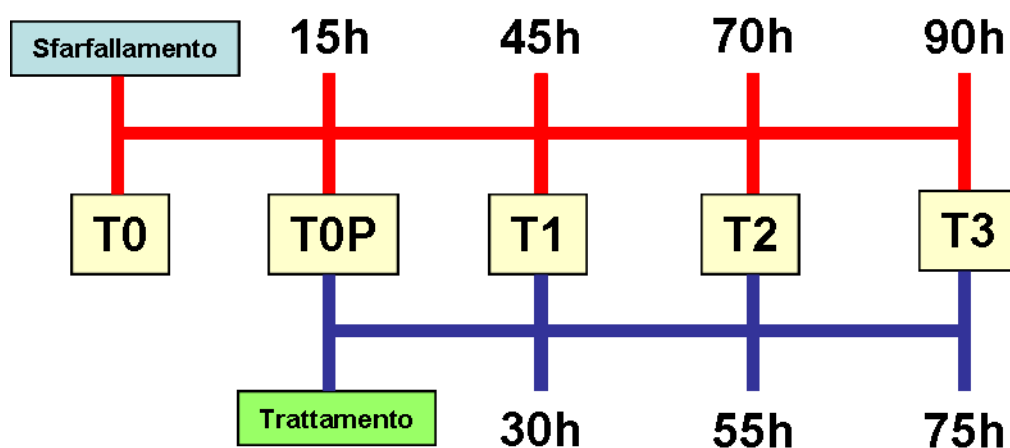


Fig. 3.5. Schema dei tempi di prelievo in relazione allo sfarfallamento e al trattamento topico. T0: sfarfallamento; T0P: 15 ore (h) dallo sfarfallamento, momento del trattamento topico; T1: 45 ore dallo sfarfallamento, 30 ore dal trattamento; T2: 70 ore dallo sfarfallamento, 55 ore dal trattamento; T3: 90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento.

3.6.6 Conteggio degli ovarioli

Per verificare se il trattamento con il principio attivo determinasse una degenerazione totale degli ovarioli (quindi la loro diminuzione numerica) si è proceduto al conteggio degli ovarioli di ciascun ovario di 5 femmine di controllo e 5 femmine trattate, in contemporanea alle descrizioni delle alterazioni morfologiche. Sui dati ottenuti sono stati effettuati i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov per verificare la normalità e l'omoschedasticità dei dati, e per verificare se vi fossero differenze significative nel numero medio di ovarioli nei trattati e nei controlli è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA a una via a confronti pianificati con il programma STATISTICA 7.1, selezionando il livello di significatività $p < 0.05$.

3.6.7 Analisi morfologica ed ultrastrutturale degli ovarioli

Con le stesse modalità impiegate per l'analisi degli ovarioli al microscopio ottico a fresco (vedi paragrafo 3.6.4), ovari provenienti da femmine trattate e da femmine di controllo sono stati preparati per l'analisi tramite microscopia ottica in resina e microscopia elettronica.

Gli ovari destro e sinistro di 10 femmine per T0, 10 femmine per T0P e 20 femmine (10 trattate e 10 di controllo) per ciascun periodo T1, T2 e T3, sono stati espianati con le stesse modalità descritte nel paragrafo 3.6.2, con la differenza che l'espianato è stato effettuato su un vetrino da orologio contenente un fissativo costituito da glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato di sodio 0.125 M, pH 7.3, raffreddato in ghiaccio. Gli ovari erano in seguito trasferiti in provette di vetro da 3 ml contenenti il fissativo per 4 ore a 4°C. Dopo la fissazione gli ovari sono stati sottoposti a quattro lavaggi da 15 minuti ciascuno in tampone cacodilato di sodio 0.125 M con 6% saccarosio e ad una post-fissazione di 12 ore in tetrossido di osmio all'1% in tampone cacodilato di sodio 0.125 M con 6% saccarosio. Terminata la post-fissazione, sono stati effettuati tre lavaggi da 15 minuti ciascuno in tampone cacodilato di sodio 0.125 M con 6% saccarosio, seguiti da una disidratazione in sei soluzioni crescenti di alcool etilico (alcool 50°, alcool 70°, alcool 80°, alcool 90°, alcool 95°, alcool 100°), effettuando tre passaggi da 10 minuti ciascuno in ogni soluzione .

Dopo i passaggi in alcool i campioni erano sottoposti rispettivamente a tre passaggi da 3 minuti ciascuno in una soluzione 1:1 di alcool 100° e ossido di propilene e tre passaggi da 3 minuti ciascuno in ossido di propilene puro, e si è poi proceduto all'inclusione in resina. La resina era una miscela a quattro componenti di Araldite M, Epon 812 e DDSA, con DMP-30 (epossiammina terziaria come acceleratore). Tutti i prodotti utilizzati sono stati forniti da Fluka Chemie GmbH (Bucks, Svizzera). I pezzi erano infiltrati in resina secondo il seguente schema: 3 ore in una miscela di resina:ossido di propilene 3:1, 4 ore in una miscela di resina:ossido di propilene 1:1, 12 ore in una miscela di resina:ossido di propilene 1:3.

I campioni sono stati quindi trasferiti in resina pura per 2 ore e poi inclusi nelle apposite formelle di silicone riempite di resina pura. Durante quest'ultima fase le coppie di ovari sono state separate e in ogni pozzetto della formella è stato deposto un singolo ovario. Le formelle sono state quindi poste in una stufa per 15 ore a 45 °C, per altre 12 ore a 55 °C ed infine per 72 ore a 62 °C. Una volta polimerizzata la resina, si è proceduto alle operazioni di taglio.

Per la microscopia ottica gli ovari sono stati tagliati in sezioni semifini di spessore 1.5 µm e le sezioni sono state raccolte serialmente per individuare eventuali anomalie a livello degli elementi citologici (morfologia delle cellule, aspetto del nucleo e del citoplasma). Le sezioni semifini sono state ottenute con lame di vetro montate sull'ultramicrotomo Reichert Om U2 (Reichert, Vienna, Austria), raccolte su vetrini portaoggetti e quindi colorate con una

soluzione di blu di metilene in sodio borato 1:1. Successivamente si è proceduto all'osservazione delle sezioni tramite microscopio ottico Nikon Eclipse 80i, (Nikon Instruments Europe), fotografandole con la fotocamera Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Nikon Instruments Europe) montata sul microscopio.

Ottenuto un quadro generale dell'aspetto e della morfologia degli ovaroli sia nei trattati sia nei controlli, si è proceduto all'allestimento di sezioni ultrafini per l'osservazione in microscopia elettronica a trasmissione. Sezioni ultrafini dello spessore di 60-70 nm sono state ottenute con l'aiuto del Prof. Gilberto Grandi (Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, dell'Università di Ferrara) impiegando una lama di diamante montata su un ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Reichert, Vienna, Austria). Le sezioni ultrafini sono state raccolte su griglie di rame da 100 mesh, ricoperte con Formvar (n.215-412-8400, Electron Microscopy Science, Hatfield, Pennsylvania, USA). In seguito è stata eseguita la colorazione di contrasto con acetato di uranile e citrato di piombo. Le osservazioni sono state condotte con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Hitachi H800 (Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Germania) presso il centro di Microscopia Elettronica dell'Università di Ferrara.

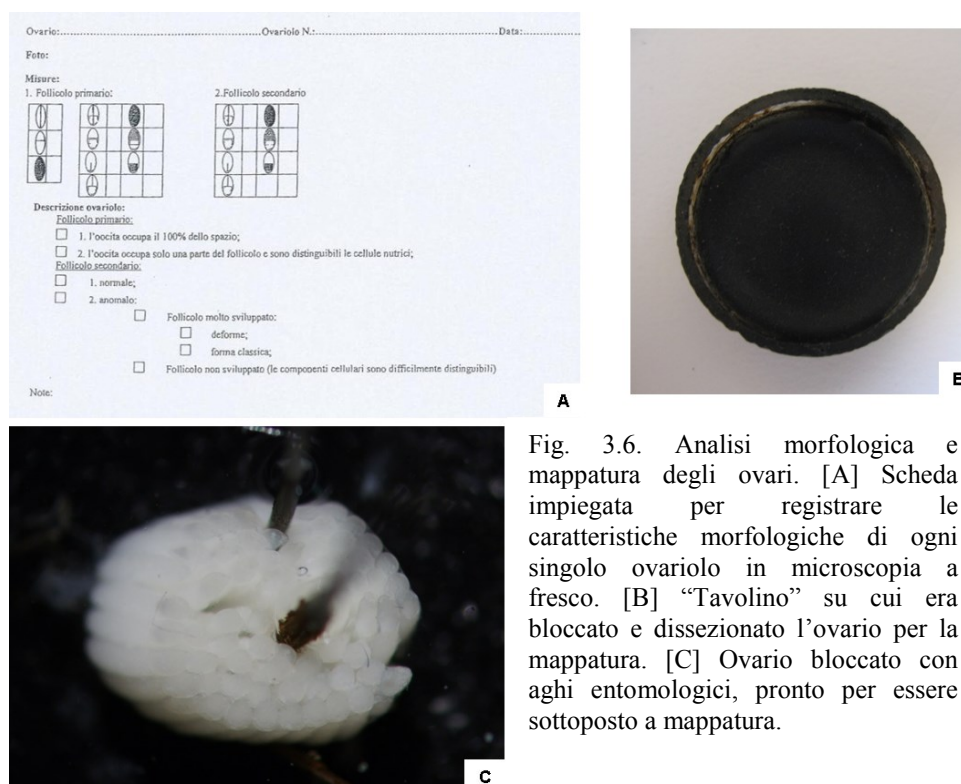


Fig. 3.6. Analisi morfologica e mappatura degli ovari. [A] Scheda impiegata per registrare le caratteristiche morfologiche di ogni singolo ovario in microscopia a fresco. [B] "Tavolino" su cui era bloccato e dissezionato l'ovario per la mappatura. [C] Ovario bloccato con aghi entomologici, pronto per essere sottoposto a mappatura.

3.7 Saggio immunoenzimatico (EIA)

Sulle femmine di *M. domestica* trattate e non trattate con diofenolan è stato eseguito un saggio immunoenzimatico (EnzymeImmunoAssay, EIA) elaborato e messo a punto dal Prof. Jean-Paul Delbecque dell'Università di Bordeaux (Francia). La tecnica è stata appresa durante un soggiorno di ricerca effettuato dall'autore della tesi nel mese di luglio 2011 presso l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), Université de Bordeaux (France), diretto dal Prof. Delbecque, che ha messo gentilmente a disposizione i protocolli per i saggi, l'anticorpo primario policlonale per gli ecdisteroidi e il tracciante enzimatico 2-succinil-20-idrossiecdisone-perossidasi. Il saggio EIA è in grado di valutare l'andamento del titolo degli ecdisteroidi durante la maturazione degli ovari, evidenziando eventuali modifiche determinate del trattamento con l'insetticida (Porcheron et al., 1989; Bodin et al., 2007; Tine-Djebbar et al., 2011; 2012).

3.7.1 Preparazione dei campioni per EIA

Per il saggio immunoenzimatico EIA, 10 femmine di *M. domestica* sono state prelevate a 0, 15, 45, 75 e 90 ore dallo sfarfallamento e trattate con diofenolan secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6.4. Per ciascun intervallo di tempo sono state prelevate 10 femmine di controllo, trattate solo con acetone, come descritto nello stesso paragrafo. Le mosche erano addormentate con CO₂, trasferite singolarmente in provettine Eppendorf da 1.5 ml dotate di coperchio, poste immediatamente in congelatore a -20 °C e pesate individualmente tramite una bilancia analitica (AE 163, Mettler Toledo, Milano, Italia).

3.7.2 Estrazione degli ecdisteroidi

Ogni singolo esemplare, all'interno della provettina chiusa, è stato immerso in azoto liquido per 10-15 secondi, omogeneizzato per 10 secondi con un minipestello per Eppendorf in 250 µl di metanolo, ed omogeneizzato ancora per circa 10 secondi aggiungendo altri 250 µl di metanolo (Carlo Erba Reagents s.r.l, Milano, Italia). Conclusa questa fase, i campioni sono stati posti per 2 minuti in un sonicatore (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL2000, Misonix Inc., Farmingdale, New York, USA), agitati per 30 secondi e posti in bagno termostato per 1 ora a 50°C. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati a 9000 rpm per 10 minuti, ottenendo un surnatante privo di residui che è stato asportato e trasferito tramite una pipetta Gilson P200 in una provetta Eppendorf da 1.5 ml. Il metanolo nel surnatante è stato fatto evaporare in 3-4 ore ponendo le provettine aperte sotto una campana a vuoto, collocata all'interno di un bagno termostato a 50°C e collegata ad una pompa a vuoto a getto d'acqua. Terminata l'evaporazione, le provettine sono state sigillate con Parafilm (Pechiney

Plastic Packaging Co., Chicago, Illinois, USA) e poste in congelatore fino al momento del saggio immunoenzimatico.

3.7.3 EIA

Per il saggio immunoenzimatico (Enzymatic ImmunoAssay, EIA) sono state effettuate le seguenti operazioni:

1. preparazione delle soluzioni;
 2. preparazione della curva di riferimento;
 3. rivestimento (“coating”) delle piastre con l’anticorpo secondario (goat anti-rabbit IgG);
 4. risospensione in tampone e preparazione dei campioni prima del caricamento nei pozzetti;
 5. caricamento dei campioni su una piastra Falcon da 96 pozzetti;
 6. misura dell’assorbanza a 340 nm e relativa trasformazione in pg/mg.
1. Preparazione delle soluzioni: il protocollo EIA prevede la preparazione delle seguenti soluzioni e tamponi:
- a. soluzione concentrata EIA: tampone fosfato 1 M, pH 7.4;
 - b. reagente per la reazione di colorazione: dimetilsolfossido con 0.5% tetrametilbenzidina;
 - c. soluzione stock di colorazione: tampone acetato-citrato 1 M, pH 7.4;
 - d. soluzione stock di perossido di carbammide (1 mg/ml), ottenuta sciogliendo 20 mg di perossido di carbammide (urea: perossido di idrogeno 1:1, puro al 97%) in 20 ml di acqua distillata;
 - e. tampone per campioni EIA: tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4;
 - f. soluzione di lavaggio EIA: tampone fosfato 0.1 M, con 0.05% Tween 20;
 - g. soluzione con tracciante enzimatico: tampone fosfato 0.1 M con 0.25% 2-succinil-20-idrossiecdisone-perossidasi (gentilmente fornito dal Prof. Delbecque);
 - h. soluzione di colorazione: tampone acetato-citrato 0.1 M con 2% reagente per la reazione di colorazione e 0.8% soluzione stock di perossido di carbammide.

Le prime quattro sono soluzioni stock conservabili per 60 giorni a 4°C; il tampone per campioni EIA si conserva per 30 giorni a 4°C, mentre le restanti soluzioni devono essere preparate al momento del caricamento dei pozzetti. A meno di diversa indicazione, tutti i reagenti impiegati sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

2. Preparazione della curva di riferimento: la curva di riferimento è stata realizzata a partire da una soluzione madre di 20-idrossiecdisone ad una concentrazione di 10^{-3} M, ottenuta diluendo 5 mg di 20-idrossiecdisone liofilizzato (2 β , 3 β , 14 α , 20 β , 22, 25-esaidrossi-7-colesten-6-one, H5142, grado HPLC, puro al 93%, Sigma-Aldrich) in 3 ml di etanolo e portando la soluzione a 10 ml con tampone fosfato per campioni EIA (0.1 M, pH 7.4).

Come suggerito dal Prof. Delbecque e in base a prove preliminari, da questa soluzione madre sono state ottenute tramite diluizione con tampone fosfato per campioni EIA le soluzioni impiegate per la preparazione della curva di riferimento: 10^{-7} M, $10^{-7.5}$ M, 10^{-8} M, $10^{-8.5}$ M, 10^{-9} M, $10^{-9.5}$ M, 10^{-10} M e $10^{-10.5}$ M, per ogni piastra EIA (Fig. 3.7).

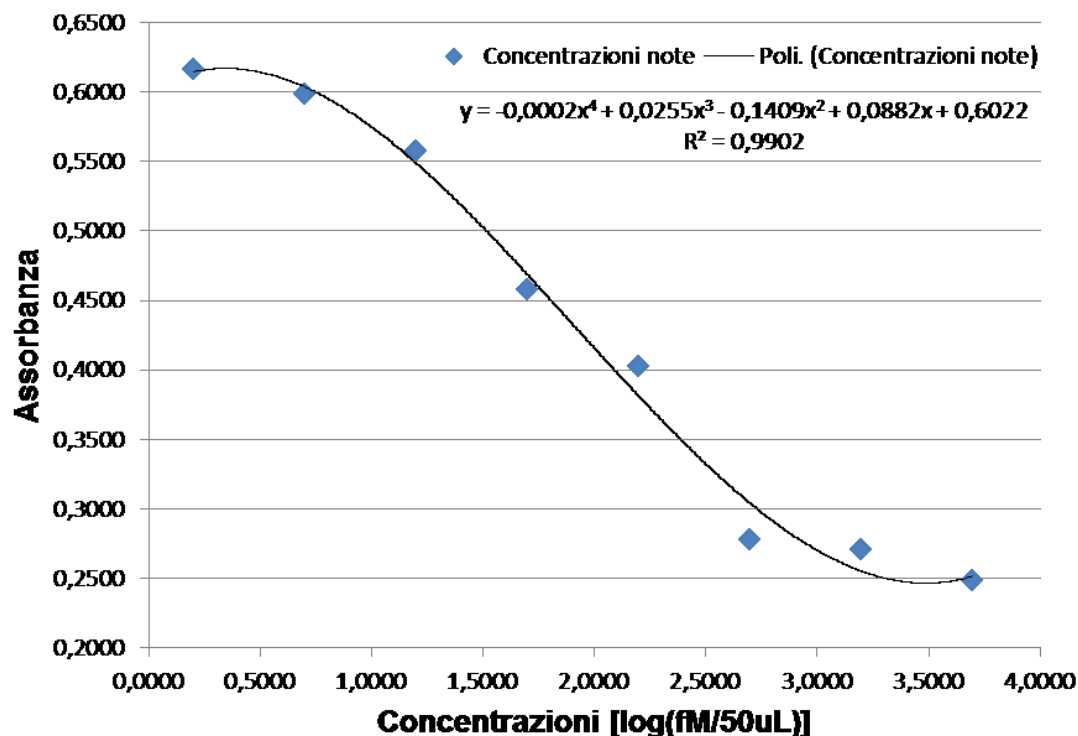


Fig. 3.7. Esempio di curva di riferimento ottenuta con 8 concentrazioni di 20-idrossiecdisone (20-OH): 10^{-7} M, $10^{-7.5}$ M, 10^{-8} M, $10^{-8.5}$ M, 10^{-9} M, $10^{-9.5}$ M, 10^{-10} M e $10^{-10.5}$ M. In ascissa: Log [20-OH]. In ordinata: Assorbanza.

3. Rivestimento (“coating”) delle piastre con l’anticorpo secondario: piastre di polistirene provviste di coperchio, da 96 pozzetti (8 x 12) a fondo piatto, ciascuno con capienza 0.4 ml (Falcon 351172 Microtest Flat Bottom, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) sono state rivestite con un anticorpo secondario (goat anti-rabbit IgG, codice 111-005-003, Jackson ImmunoResearch Europe, Oaks Drive Newmarket, Suffolk, Regno Unito). Per evitare contaminazioni sono state rivestite solo 5 piastre per volta. L’operazione di rivestimento è stata effettuata preparando una soluzione contenente 0.125 mg dell’anticorpo secondario, 5 ml di soluzione concentrata EIA e 95 ml di acqua distillata. Tramite una pipetta multicanale da 8 (Pipet-Lite XLS, Rainin Instrument, Oakland, California, USA), aliquote di 200 µl della soluzione sono state poste nei 96 pozzetti delle piastre, che in seguito sono state ricoperte con carta di alluminio e lasciate a temperatura ambiente per 24 ore. Trascorso questo periodo, a tutti i pozzetti sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione di albumina di siero bovino (0.3% in acqua distillata) e le piastre sono state poste a 4°C.

4. Risospensione e preparazione dei campioni prima del caricamento nei pozzetti: 24 ore prima del caricamento nelle piastre, i campioni contenuti nelle provettine Eppendorf sono stati risospesi in 300 µl di tampone fosfato per campioni EIA, posti in bagno termostato a 37 °C per 60 minuti, agitandoli per 3 o 4 volte. I campioni sono stati quindi mantenuti a 4 °C per 24 ore. Prima del caricamento sulla piastra, i campioni risospesi sono stati posti nuovamente in bagno termostato a 37 °C per 20 min, agitandoli per 3 o 4 volte, e centrifugati a 9000 rpm per 5 minuti per eliminare eventuali frammenti residui. Il surnatante non diluito è stato infine trasferito in altre provettine Eppendorf.

5. Caricamento della piastra: la piastra Falcon da 96 pozzetti, già rivestita, è stata sottoposta prima del caricamento a 6 lavaggi da 15 ml ciascuno con soluzione di lavaggio EIA tramite una Vacu-pette/96 (Bel-Art Scienceware 378760001, Wayne, New Jersey, USA). Il caricamento è stato eseguito secondo lo schema seguente, illustrato nella Fig. 3.8:

- inserimento in tutti i pozzetti di 50 µl della soluzione con tracciante enzimatico (tampone fosfato 0.1 M con 0.25% 2-succinil-20-idrossiecdisone-perossidasi);
- inserimento nei pozzetti 1A, 1B, 1C e 1D, indicati con la lettera T (“testimone”, o “bianco”) di 100 µl di tampone per campioni EIA privo dell’anticorpo primario (quindi pari a 0% della reazione colorimetrica);
- inserimento nei pozzetti 1E, 1F, 1G e 1H (indicati con la sigla B0) di 50 µl di tampone per campioni EIA (quindi pari al 100% della reazione colorimetrica);
- caricamento in aliquote da 50 µl dei campioni, precedentemente risospesi, nell’area della piastra tra la colonna 3 e la colonna 12, nelle lettere da A ad H, con lo stesso campione in duplicato in pozzetti contrassegnati con la stessa lettera ma in colonne adiacenti, in modo da individuare eventuali valori anormalmente fuori scala;
- caricamento della curva di riferimento: in ciascun pozzetto della colonna 2 era posta una aliquota da 50 µl a concentrazioni crescenti della soluzione di 20-idrossiecdisone precedentemente preparata;
- aggiunta a tutti i pozzetti, ad eccezione dei pozzetti T (bianco), di 50 µl di una soluzione dell’anticorpo policlonale primario diluito 1 : 100 000 con tampone fosfato per campioni EIA 0.1 M, pH 7.4;
- incubazione per la reazione immunologica, ponendo le piastre coperte e avvolte in carta di alluminio per 3 ore in un agitatore rotorbitale (PSU-2T Minishaker, BioSan, Riga, Lettonia);
- lavaggio di ogni piastra tramite Vacu-pette (come precedentemente descritto nel punto 5) e aggiunta di 200 µl della soluzione di colorazione a tutti i pozzetti, ponendo nuovamente le piastre nell’agitatore rotorbitale per 50 minuti.

6. Misura dell'assorbanza a 340 nm e calcolo della concentrazione degli ecdisteroidi: la misura dell'assorbanza è stata eseguita in un lettore ELISA (Sunrise, Tecan Group, Mannedorf, Svizzera, con software Microsoft Excel XFluor versione 4.51), su cui era montato un filtro da 340 nm. Un programma appositamente ideato dall'autore su foglio di calcolo Excel ha quindi permesso di mettere in relazione la curva di riferimento, il peso di ogni singolo individuo e l'eventuale fattore di diluizione. In questo modo è stata ottenuta la concentrazione degli ecdisteroidi in ogni femmina testata, espressi in pg/mg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T											
B	T											
C	T											
D	T											
E	B0											
F	B0											
G	B0											
H	B0											

Curva di riferimento
Area di caricamento campioni

Fig. 3.8. Schema di caricamento della piastra per EIA. Le lettere indicano le righe e i numeri indicano le colonne. A1-D1: T, o "bianco" (0% reazione colorimetrica). E1-H1: B0: 100% reazione colorimetrica. A2-H2: concentrazioni di 20-OH per la curva di riferimento. A3-H12: area di caricamento dei campioni.

3.8 Analisi morfologica ed ultrastrutturale dei corpora allata

Per evidenziare alterazioni morfologiche a carico dei corpora allata, che nei ditteri superiori sono parte dell'anello di Weismann, sono state sottoposte ad analisi morfologica ed ultrastrutturale femmine trattate e non trattate con diofenolan. Per ciascun intervallo di tempo dallo sfarfallamento (0, 15, 45, 75 e 90 ore) 10 femmine di *M. domestica* sono state prelevate e trattate con il principio attivo secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6.4.

Per ciascun intervallo di tempo sono state prelevate anche 10 femmine di controllo, trattate solo con acetone, come descritto nello stesso paragrafo. I corpi di tutte le femmine, sacrificate tramite esposizione a CO₂, subivano due dissezioni successive allo stereomicroscopio in fissativo (glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato di sodio 0.125 M, pH 7.3) per esporre l'anello di Weismann.

La prima dissezione, effettuata all'interno di una lente da orologio contenente fissativo e posta su un recipiente contenente ghiaccio, aveva lo scopo di permettere una penetrazione iniziale del fissativo nei tessuti e facilitare il distacco della cuticola a livello del dello scutum, del prescutum e dei fasci muscolari sottostanti. Nella prima dissezione sono stati asportati con pinzette finissime e forbicine da dissezione la proboscide e le ali alle base, le zampe a livello della coxa con relativo episterno, lo scutellum e l'ovopositore alla base. Dopo la prima dissezione, il corpo dell'insetto era posto per 4 ore in una provetta contenente fissativo a 4°C. Si è proceduto in seguito alla seconda dissezione, posizionando il corpo a livello del capo e dell'addome tramite aghi entomologici in un apposito blocchetto di plastica solidificata (etilene vinil acetato, "colla a caldo") opportunamente sagomato (Fig. 3.9A), mantenendolo sempre immerso in fissativo. Sono state asportate le cuticole dello scutum e del prescutum, esponendo i fasci muscolari e le parti sottostanti, cioè l'aorta dorsale e il tratto digerente con il proventricolo (Fig. 3.9B). Terminata l'operazione, sono stati asportati il capo a livello del collo e l'addome a livello del punto di unione con il torace. La porzione restante, composta solo da una parte del torace contenente l'anello di Weismann, è stata posta di nuovo in fissativo per 12 ore a 4°C. Le procedure di lavaggio, post-fissazione, disidratazione, infiltrazione, permanenza in stufa, ottenimento delle sezioni semifini ed ultrafini, ed acquisizione delle immagini sono state precedentemente descritte nel paragrafo 3.6.7. Per ogni intervallo di tempo sono stati allestiti per la microscopia ottica almeno 5 corpora allata, tagliati serialmente in sezioni semifini spesse 1.5 µm, per un totale di 40 organi completamente serati. Per la microscopia elettronica sono stati tagliati e preparati almeno 3 corpora allata per ogni intervallo di tempo.

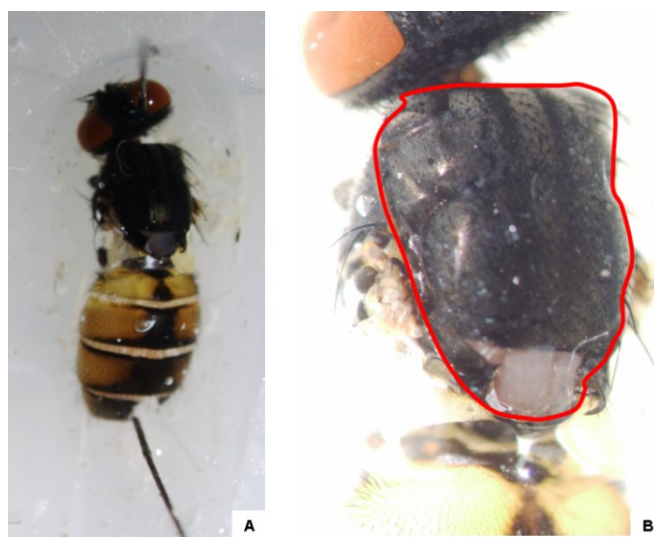


Fig. 3.9. Femmina di *M. domestica* durante la seconda dissezione per l'analisi dei corpora allata. [A] Esemplare bloccato con aghi entomologici. [B] Dettaglio del prescutum, scutum e scutellum: la linea rossa delimita l'area di asportazione della cuticola e dei sottostanti fasci muscolari.

3.8.1 Analisi volumetrica e conteggio cellulare dei corpora allata

Per evidenziare possibili anomalie volumetriche nei campioni trattati con diofenolan in paragone ai campioni di controllo sono state effettuate misure del volume dei corpora allata nei vari intervalli di tempo esaminati. Le misure sono state effettuate sui preparati serati con sezioni semifini dei corpora allata. Per ogni singola sezione, è stata misurata l'area della regione dei corpora allata di almeno 5 femmine trattati e di controllo per ciascun intervallo, tramite il software di analisi di immagine NIS-Elements Documentation (Nikon Instruments Europe), precedentemente impiegato per le analisi morfometriche degli ovaroli. Il valore di ogni singola area è stato moltiplicato per lo spessore della sezione (1.5 μm) e sommata alle altre per ottenere il volume totale della ghiandola. Sui dati volumetrici relativi all'intera ghiandola sono stati effettuati i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov per verificare la normalità e l'omoschedasticità dei dati. Per verificare la presenza di eventuali differenze significative tra le femmine trattate e le femmine di controllo è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA a una via a confronti pianificati con il programma STATISTICA 7.1, selezionando il livello di significatività $p < 0.05$.

Per verificare sia nei trattati sia nei controlli l'eventuale presenza di un'attività iperplastica e/o ipertrofica, oltre all'analisi volumetrica è stato effettuato un conteggio delle cellule costituenti i corpora allata, in base al numero dei nuclei. Come per l'analisi volumetrica il conteggio cellulare è stato condotto su sezioni seriate semifini dei corpora allata. Tutte le sezioni seriate di almeno 5 femmine trattate e 5 di controllo per ciascun intervallo di tempo sono state fotografate tramite fotocamera Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Nikon Instruments Europe), precedentemente impiegata per gli ovari. Le immagini acquisite dei corpora allata di ciascuna femmina sono state ordinate in un file Power Point ed esaminate per il conteggio dei nuclei (e quindi delle corrispondenti cellule). Sui dati riguardanti il numero di cellule nei corpora allata sono stati effettuati i test di Levene e di Kolmogorov-Smirnov per verificare la normalità e l'omoschedasticità dei dati. Per verificare la presenza di eventuali differenze significative tra le femmine trattate e le femmine di controllo è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA a una via a confronti pianificati con il programma STATISTICA 7.1, selezionando il livello di significatività $p < 0.05$.

3.9 Analisi ultrastrutturale delle uova deposte nei tre cicli gonotrofici

Con una procedura identica a quella descritta nel paragrafo 3.6.3 sono state ottenute uova da femmine trattate e di controllo. Sono state quindi valutate tramite SEM eventuali alterazioni ultrastrutturali a livello della superficie del corion di uova deposte nei primi tre cicli gonotrofici, impiegando lo stesso protocollo illustrato nel paragrafo 3.5.

4. RISULTATI

4.1 Valutazione della tossicità del diofenolan sugli stadi immaturi

I risultati derivati dagli esperimenti di mortalità al diofenolan somministrato topicamente sugli stadi immaturi di *Musca domestica*, ceppo s-DBF, hanno permesso di ottenere una retta di regressione (LDP – Log-Dose-Probitline) che esprime la relazione dose-mortalità (Fig. 4.1) i cui parametri sono riportati nella Tabella 4.1. La DL_{50} ottenuta per il ceppo in esame è 4.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ovvero $\mu\text{g}/\text{individuo}$, come indicato nei Materiali e Metodi) con intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.) compreso tra 3.94 e 5.56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La DL_{90} per lo stesso ceppo è 25.76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, con intervallo di confidenza al 95% compreso tra 19.91 e 35.81 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

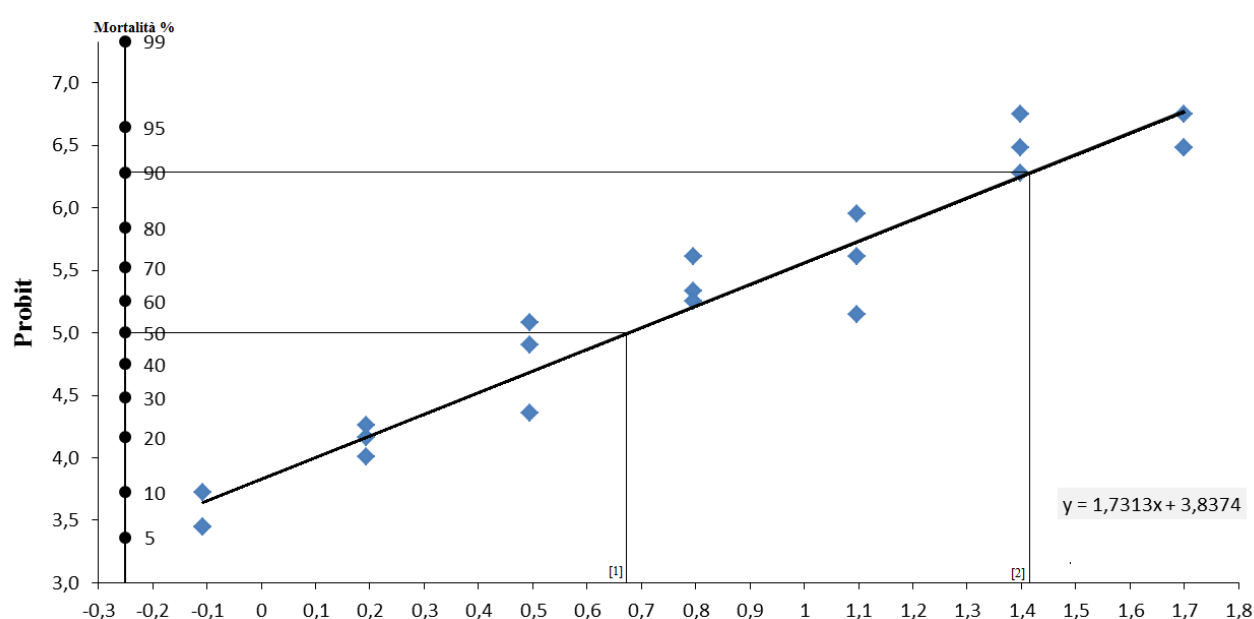


Fig. 4.1. Retta dose-mortalità relativa ai trattamenti topici eseguiti con diofenolan. Probit = Mortalità % secondo la formula di Abbott (1925); $DL_{50} = 10^{[1]} = 4.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; $DL_{90} = 10^{[2]} = 25.76 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Ceppo	N. insetti	Pendenza \pm ES	Intercetta	DL_{50} (95% IC)	DL_{90} (95% IC)
s-DBF	720	1.7313 ± 0.117	3.8374	4.7 [3.94-5.56]	25.76 [19.91-35.81]

Tabella 4.1. Diofenolan: principali parametri (pendenza, intercetta) della retta dose-mortalità in Fig. 4.1; DL_{50} e DL_{90} espresse in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con relativo intervallo di confidenza al 95% (95% IC)

4.2 Analisi morfologica delle larve e dei pupari

La mortalità è stata verificata ed espressa in percentuale, considerando, come illustrato nella Tabella 4.2, il numero degli esemplari sfarfallati normalmente, degli esemplari deceduti allo stadio di larva e degli esemplari deceduti allo stadio di pupa, visibili come pupari larviformi e pupari apparentemente normali ma senza alcun segno di sfarfallamento, ed infine esemplari adulti deceduti durante la fase di sfarfallamento e intrappolati nel pupario.

Dai dati riportati è evidente come la mortalità sia più marcata allo stadio pupale, poiché la mortalità larvale è presente ma a percentuali estremamente basse, rispettivamente del 3 e 2% solo per le dosi di 6.25 µg/µl e 12.5 µg/µl. I pupari senza segni di sfarfallamento sono più frequenti all'aumentare della dose, fino a raggiungere il massimo di mortalità, pari al 96%, per la dose più elevata (50 µg/µl), mentre esemplari adulti morti e rimasti imprigionati nel pupario sono presenti con percentuali più elevate a basse dosi e diminuiscono considerevolmente alle dosi più elevate.

4.2.1 Analisi morfologica ed ultrastrutturale dei pupari

Morfologia del controllo. I pupari appartenenti al gruppo di controllo, derivanti da esemplari trattati con 1µl di acetone con le stesse modalità impiegate per i trattati, si presentano con la classica colorazione bruno-rossastra e forma a barilotto, con la parte anteriore maggiormente appuntita e la posteriore più rotondeggiante, dovuta alla contrazione del corpo, in particolare del segmento cefalico e della parte anteriore del protorace (Fig. 4.2A). Il pupario appare metamerico, con evidenti strie e spine intersegmentali nel torace e nell'addome: le strie e le spine dei segmenti toracici sono organizzate in 5 ordini circolari. Alcune strie sono presenti anche nelle regioni intersegmentali della zona addominale, in posizione dorsale, mentre sul lato ventrale si nota un fitto sistema di spine di forma triangolare (Fig. 4.2A-D).

Nella parte anteriore del protorace sono presenti due serie di spiracoli, in numero variabile da sei ad otto, costituiti ciascuno da una papilla formata da una struttura cilindro-conica, chiusa alla sommità da un elemento convesso (Fig.4.2D-F). All'estremità dell'ottavo segmento addominale sono presenti due piastre respiratorie, delimitate da un peritrema a forma di "D", leggermente sollevato (Fig 4.2G). Ciascuna piastra ha:

- quattro spiracoli digitiformi sul bordo del peritrema;
- uno spiracolo a forma di fessura ad andamento sinuoso che decorre lungo il bordo;
- uno spiracolo a forma di bottone nei pressi del bordo rettilineo del peritrema.

Nell'ottavo segmento addominale, in posizione ventrale, si trova la placca anale a forma di losanga e ornata di spine (Fig. 4.2H,I).

La morfologia dei pupari di controllo (ottenuti da trattamenti topici di larve al terzo stadio con 1 µl di acetone) appare del tutto identica a quella dei pupari di individui che non hanno subito alcun trattamento.

Morfologia del trattato. Il trattamento con diofenolan effettuato sulle larve ha determinato la formazione di due tipi di pupari:

- pupari con morfologia apparentemente simile a quella dei controlli: è la più comune ed il suo aspetto è del tutto paragonabile a quello dei controlli (Fig. 4.3A-E), con l'eccezione delle due piastre respiratorie posizionate nell'estremità dell'ottavo segmento addominale, che presentano un aspetto del tutto anomalo; in queste piastre è infatti presente solo lo spiracolo a forma di bottone e, in sostituzione degli altri elementi, si osserva una serie di rigonfiamenti mammellonari di dimensioni variabili (Fig.4.3F-H)

- pupari larviformi: si tratta di un morfotipo (rinvenuto in soli quattro esemplari) che si caratterizza per pigmentazione e grado di sclerotizzazione simile al controllo ma che per aspetto è simile ad una larva (Fig. 4.4A). Il corpo sembra non aver subito il tipico processo di contrazione, quindi non presenta la tipica forma a barilotto della pupa; la contrazione è riconoscibile solo nel capo e nel protorace e, di conseguenza, le dimensioni complessive del corpo appaiono maggiori di circa il 25% rispetto ai controlli. Anche nel pupario larviforme è presente una marcata metameria, con evidenti strie e spine intersegmentali ma, rispetto al controllo, si notano, a livello dell'addome e in posizione laterale, invaginazioni a forma di goccia al cui apice si trova una piccola apertura: queste invaginazioni con ogni probabilità corrispondono ai siti di inserzione muscolare (Fig. 4.4B-E). Gli spiracoli papilliformi situati nella parte anteriore del protorace (Fig. 4.4F, G) appaiono fortemente alterati, presentando in alcuni casi protuberanze rotondeggianti all'apice e in altri deformità tali da modificarne radicalmente la forma originale (Fig. 4.5A-D). Come nel morfotipo precedente le piastre respiratorie appaiono modificate ma con gradi di alterazione più marcati, riconducibili a due principali tipologie:

- piastra respiratoria con importanti protuberanze lamellari a livello dello spiracolo sinuoso;
- piastra respiratoria totalmente alterata, in cui non è possibile individuare le tipiche strutture, ma in cui è presente una sola protuberanza centrale (Fig. 4.5E-H).

4.2.2 Analisi morfologica ed ultrastrutturale delle larve

Data la presenza di marcate anomalie a livello degli spiracoli papilliformi e delle piastre respiratorie nei pupari derivanti da larve al terzo stadio trattate con diofenolan, è stato necessario verificare se tali danni comparissero anche allo stadio larvale, a 48 ore dal trattamento.

Per quanto riguarda gli spiracoli papilliformi, i trattati non hanno generalmente evidenziato quadri morfologici differenti dai controlli (Fig. 4.5I, J), mentre per le piastre respiratorie la situazione è molto simile a quella dei pupari derivanti da esemplari trattati. Le piastre si caratterizzano in particolare per la presenza di rigonfiamenti e protuberanze più o meno marcate, che rendono l'aspetto di queste strutture molto diverso da quello dei controlli (Fig. 4.5K-M).

4.2.3 Analisi morfologica degli adulti imprigionati nel pupario

Come precedentemente menzionato, tra gli individui deceduti prima di sfarfallare molti non sono stati in grado di liberarsi completamente dal pupario. Questa situazione è stata riscontrata sia nei pupari con aspetto simile a quelli di controllo sia nei pupari con aspetto larviforme. Esaminando gli adulti rimasti intrappolati è emersa una caratteristica comune, cioè la presenza attorno al secondo e terzo paio di zampe (in particolare a livello dei tarsali) di residui della cuticola pupale, che formano una sorta di manicotto (Fig.4.6A-D).

Dosi testate	% morti	% di morti in base allo stadio di sviluppo^(a)		% adulti sfarfallati
Controllo	1	larva	---	99
		pupa	100	
		adulto	---	
0.78 µg/µl	8	larva	---	92
		pupa	25	
		adulto	75	
1.56 µg/µl	20	larva	---	80
		pupa	40	
		adulto	60	
3.12 µg/µl	42	larva	---	58
		pupa	39	
		adulto	61	
6.25 µg/µl	65	larva	3	35
		pupa	66	
		adulto	31	
12.5 µg/µl	71	larva	2	29
		pupa	83	
		adulto	15	
25 µg/µl	93	larva	---	7
		pupa	92	
		adulto	8	
50 µg/µl	94	larva	---	6
		pupa	96	
		adulto	4	

Tabella 4.2. Percentuale di individui sfarfallati e deceduti in base alle dosi testate: (a) le percentuali sono state ottenute in base al numero totale di individui deceduti suddivisi per stadio raggiunto al momento della morte. La percentuale di esemplari morti allo stadio pupale si riferisce ad esemplari i cui pupari non mostravano alcun segno di sfarfallamento; la percentuale di esemplari morti allo stadio adulto si riferisce ad individui deceduti e rimasti imprigionati nel pupario.

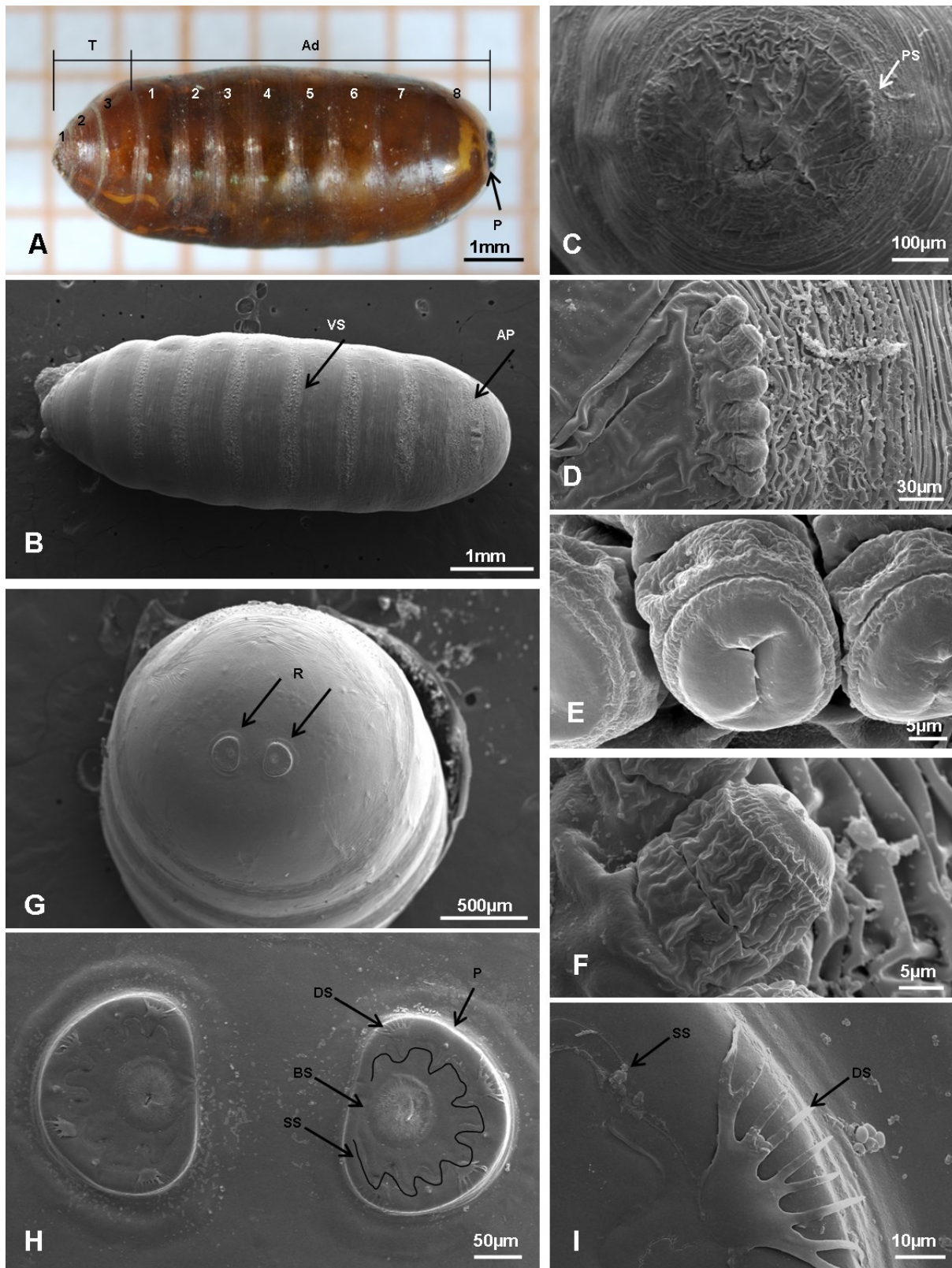


Fig. 4.2. Pupario di un individuo di controllo. [A] Immagine allo stereomicroscopio di un pupario *in toto*, visione dorsale. [B-I] Immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM). [B] Pupario *in toto*, visione ventrale. [C] Regione cefalica e protoracica. [D] Spiracoli papilliformi nella parte anteriore del protorace. [E] Dettaglio della regione apicale di uno spiracolo papilliforme. [F] Dettaglio della parte laterale dello spiracolo papilliforme. [G] Regione posteriore del pupario con due piastre respiratorie. [H] Piastre respiratorie a forma di "D". [I] Dettaglio di uno spiracolo digitiforme e parte di uno spiracolo sinuoso. R: piastra respiratoria; PS: spiracolo papilliforme; T: torace; Ab: addome; SS: spiracolo sinuoso; DS: spiracolo digitiforme; BS: spiracolo a "bottone"; AP: piastra anale; VS: spine addominali ventrali; P: peritreme.

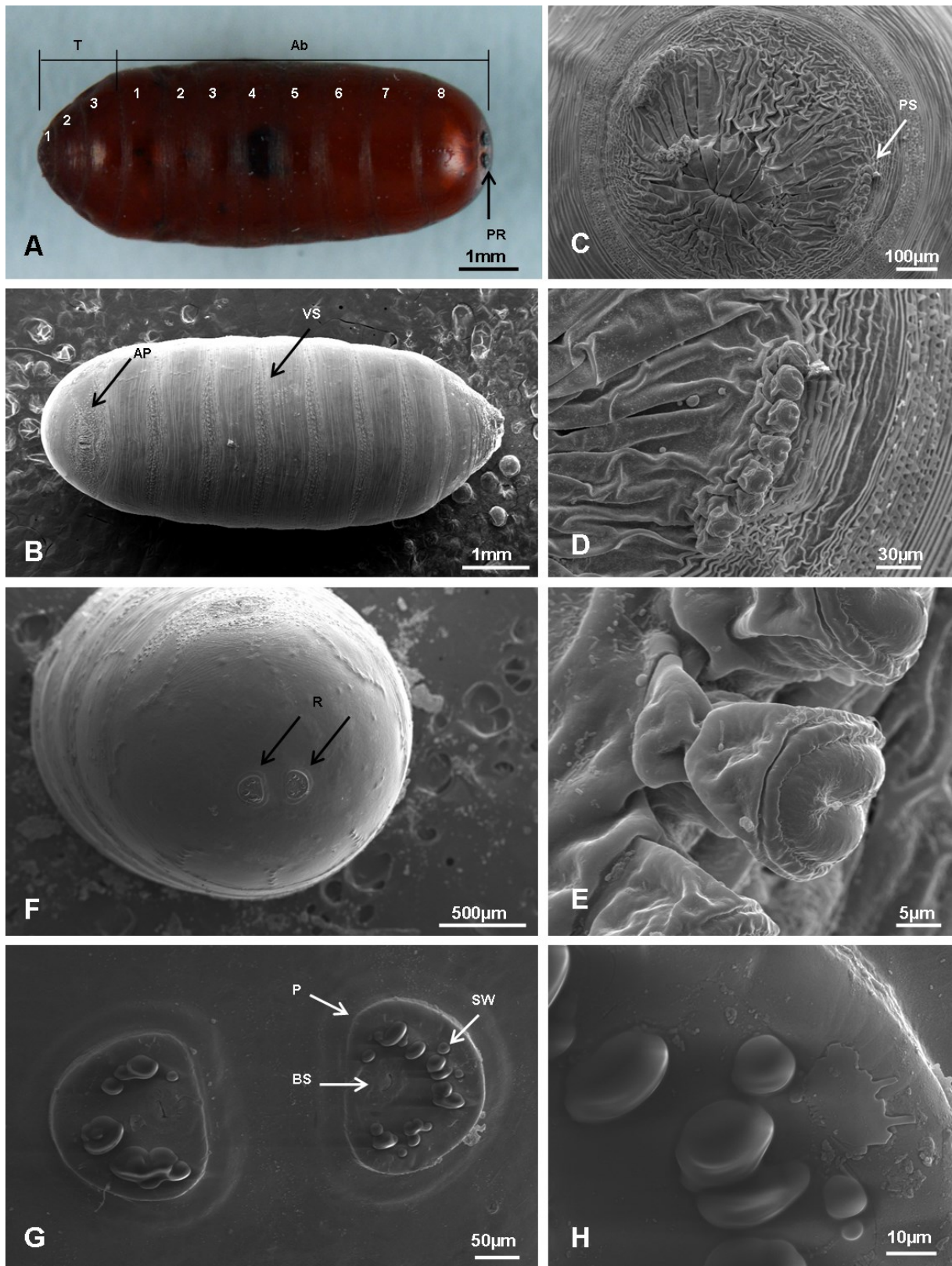


Fig. 4.3. Pupario di un individuo trattato, apparentemente simile a quello di un individuo di controllo. [A] Immagine allo stereomicroscopio del pupario *in toto*, visione dorsale [B-H]. Immagini al SEM. [B] Pupario *in toto*, visione ventrale. [C] Regione cefalica e protoracica. [D] Spiracoli papilliformi nella parte anteriore del protorace. [E] Dettaglio della regione apicale di uno spiracolo papilliforme. [F] Regione posteriore del pupario con due piastre respiratorie. [G] Piastre respiratorie alterate. [H] Dettaglio di un rigonfiamento mammellonare. SW: rigonfiamento mammellonare. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.2.

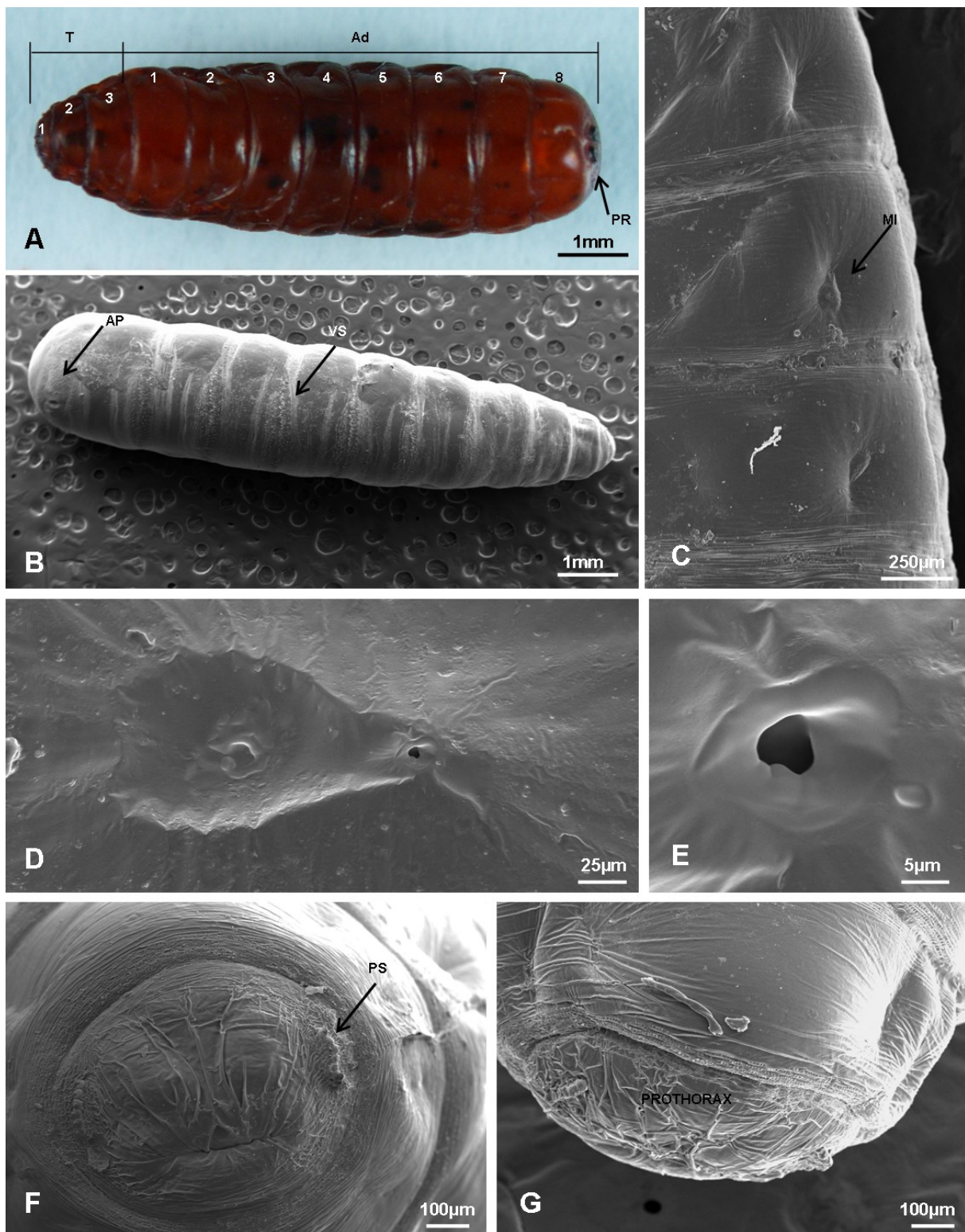


Fig. 4.4. Pupario di un individuo trattato con aspetto larviforme. [A] Immagine allo stereomicroscopio del pupario *in toto*, visione dorsale. [B-G]. Immagini al SEM. [B] Pupario *in toto*, visione ventrale. [C] Regione addominale laterale con siti di inserzione muscolare. [D] Dettaglio di un sito di inserzione muscolare con invaginazione a forma di goccia. [E] Dettaglio dell'apertura. [F] [G] Regione cefalica e protoracica. MI: siti di inserzione muscolare. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.2

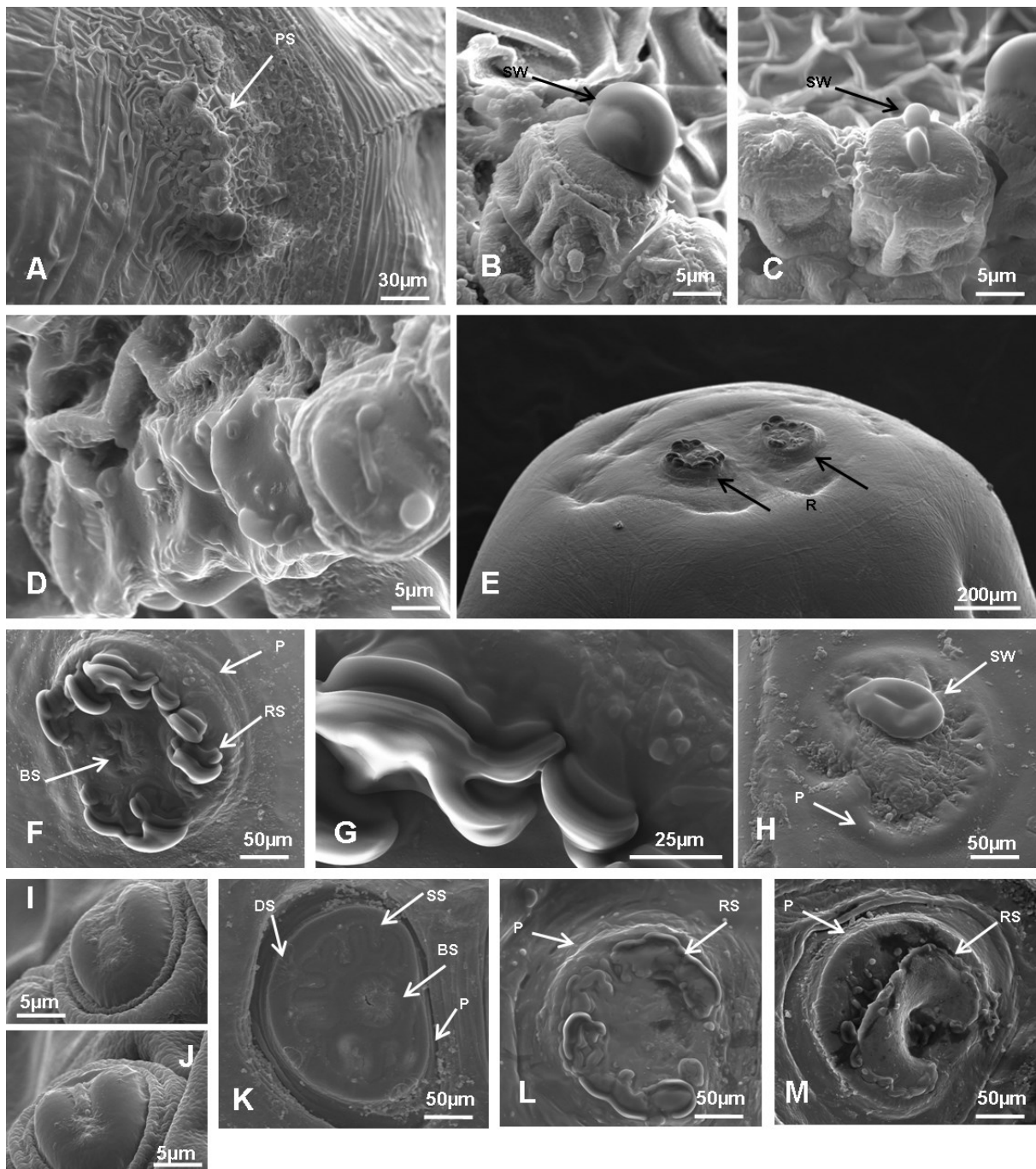


Fig. 4.5. [A-H]. Immagini al SEM di pupari con aspetto larviforme. [A] Spiracoli papilliformi nella parte anteriore del protorace. [B-C] Spiracolo papilliforme alterato con rigonfiamenti mammellonari. [D] Spiracoli papilliformi completamente deformati. [E] Regione posteriore con piastre respiratorie alterate. [F-H] Dettaglio delle piastre respiratorie alterate. [I-M]. Immagini al SEM di larve di controllo e trattate. [I] Regione apicale di uno spiracolo anteriore di una larva di controllo. [J] Regione apicale di uno spiracolo anteriore di una larva trattata. [K] Piastra respiratoria a forma di "D" di una larva di controllo. [L] [M] Piastre respiratorie a forma di "D" di larve trattate con evidenti alterazioni. RS: rigonfiamenti a forma di cresta. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.2 e 4.3.

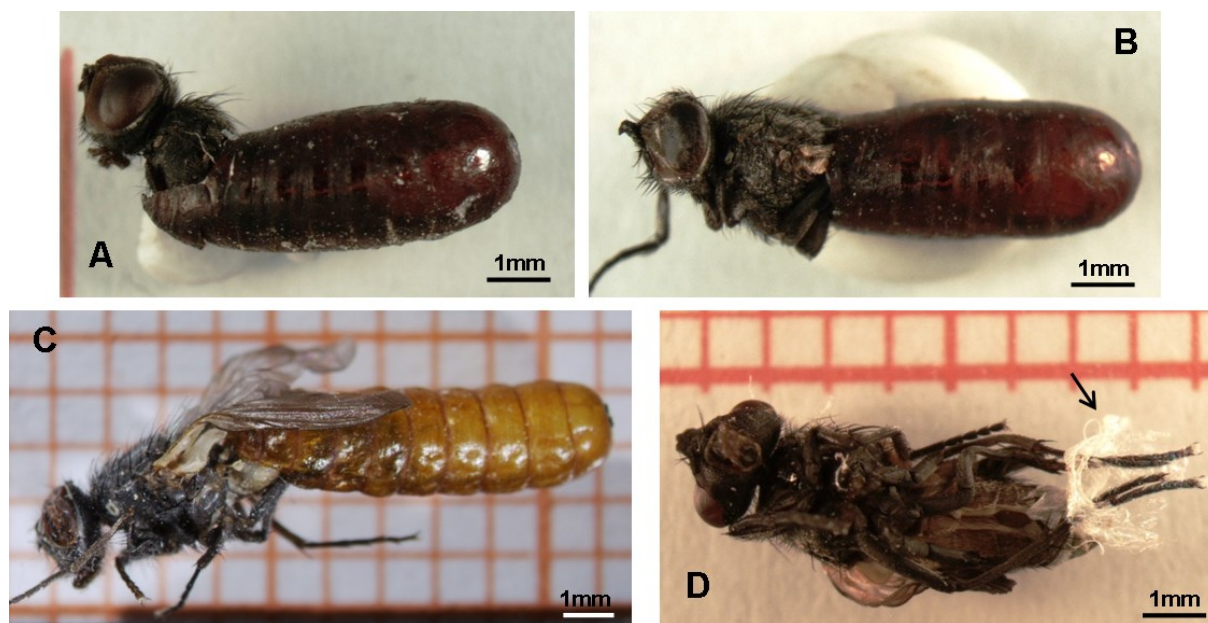


Fig. 4.6. Immagini allo stereomicroscopio. [A-B] Adulti morti all'interno di pupari simili a quelli di controllo. [C] Adulto morto all'interno di un pupario larviforme. [D] Adulto morto estratto tramite dissezione da un pupario simile a quelli di controllo: nella regione tarsale sono visibili alcuni residui della cuticola del pupario che formano una sorta di "manicotto" (freccia).

4.3 Test di fecondità

La fecondità è stata misurata come numero medio di uova deposte da femmine sottoposte a trattamento topico con dosi di 5 µg/µl, 25 µg/µl, 50 µg/µl e 75 µg/µl di diofenolan.

Il test di fecondità preliminare ha mostrato differenze significative ($p < 0.05$) tra il numero medio di uova deposte nei trattati rispetto ai controlli, ed anche tra i trattati alle diverse dosi. Più precisamente sono presenti differenze significative ($p < 0.05$) tra la dose più bassa (5 µg/µl) e le altre tre dosi (25 µg/µl, 50 µg/µl e 75 µg/µl) mentre non si evidenziano differenze significative ($p > 0.05$) tra le tre dosi più elevate (Fig. 4.7). In particolare la fecondità delle femmine diminuisce percentualmente di circa il 33% rispetto al controllo con 5 µg/µl ed una diminuzione maggiore, pari a circa il 66%, si ottiene con 25 µg/µl. Le due dosi più elevate determinano diminuzioni ancora più marcate nella ovideposizione, rispettivamente 70% per 50 µg/µl e 72% per 75 µg/µl (Tabella 4.3).

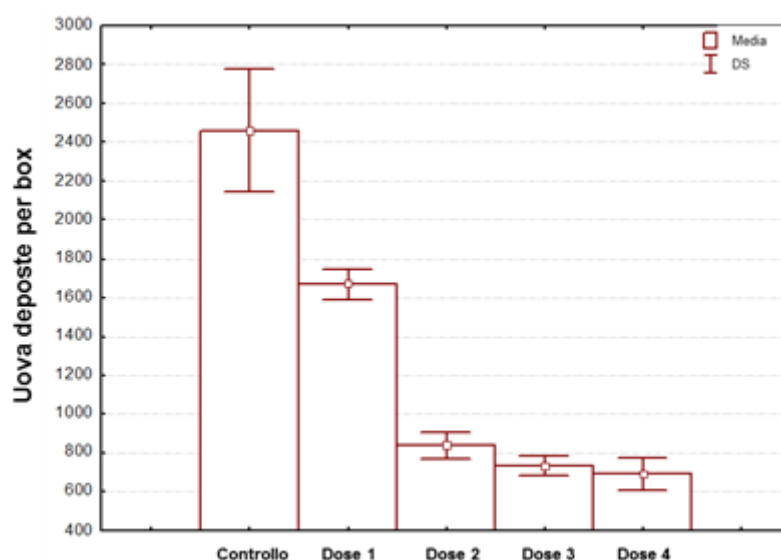


Fig. 4.7. Media \pm DS (deviazione standard) del numero totale di uova deposte da femmine di controllo (trattate con 1 µg/µl acetone) e femmine trattate con diofenolan. Dose 1 = 5 µg/µl; Dose 2 = 25 µg/µl; Dose 3 = 50 µg/µl; Dose 4 = 75 µg/µl

	Numero medio di uova deposte per box \pm DS	Diminuzione nella ovideposizione (%)
Controllo	2461.3 \pm 330.8	---
5 µg/µl	1668.6 \pm 82.1	33
25 µg/µl	837.3 \pm 76.5	66
50 µg/µl	736.0 \pm 52.5	70
75 µg/µl	690.0 \pm 86.9	72

Tabella 4.3. Numero medio di uova deposte per box \pm DS.

4.4 Analisi macroscopica

Gli ovari appena espantati di femmine trattate, prelevati a 90 ore dallo sfarfallamento, presentano allo stereomicroscopio forma e dimensioni apparentemente paragonabili a quelle dei controlli. Un'osservazione più dettagliata a livello dei singoli ovaroli rivela invece differenze tra i trattati ed i controlli.

Controlli. Gli ovaroli delle femmine di controllo hanno morfologia molto omogenea e sono costituiti da un follicolo primario al cui interno è presente un oocita maturo, prossimo alla deposizione (Fig. 4.8A), e da un follicolo secondario al cui interno è presente un oocita in vitellogenesi, sovrastato dalle cellule nutrici che occupano 3/4 dell'intera camera follicolare (Fig. 4.8B e C).

Trattati. Gli ovaroli delle femmine trattate presentano invece un quadro estremamente eterogeneo (Fig. 4.9A), in cui è possibile riconoscere:

- ovaroli completamente immaturi, che presentano un follicolo (non è chiaro se primario o secondario) in piena vitellogenesi, con l'oocita che occupa circa il 50% dell'intera camera follicolare ed un follicolo secondario in previtellogenesi (Fig. 4.9B);
- ovaroli con follicolo primario identico a quello descritto nel controllo ed un follicolo secondario ipersviluppato, con dimensioni circa doppie rispetto al controllo, con l'oocita che occupa circa il 50% della camera follicolare (Fig. 4.9C);
- ovaroli con follicolo primario identico a quello descritto nel controllo ed un follicolo secondario poco sviluppato, con dimensioni ridotte rispetto al controllo ed un oocita che ha appena iniziato la vitellogenesi (Fig. 4.9D);
- ovaroli con follicolo primario identico a quello descritto nel controllo e follicolo secondario privo delle normali componenti di un follicolo di controllo della stessa età (oocita, cellule nutrici e cellule follicolari), nel quale si osserva un ammasso di cellule prive di un'organizzazione ben definita (Fig. 4.9B).

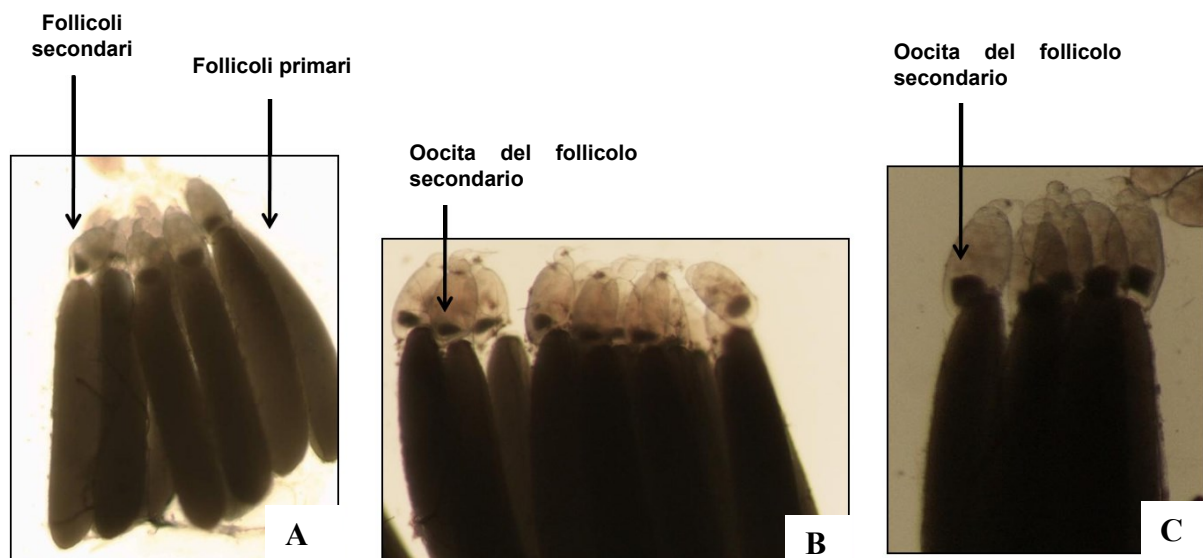


Fig. 4.8. Ovarioli di femmine di controllo. A, B e C (vedi testo).

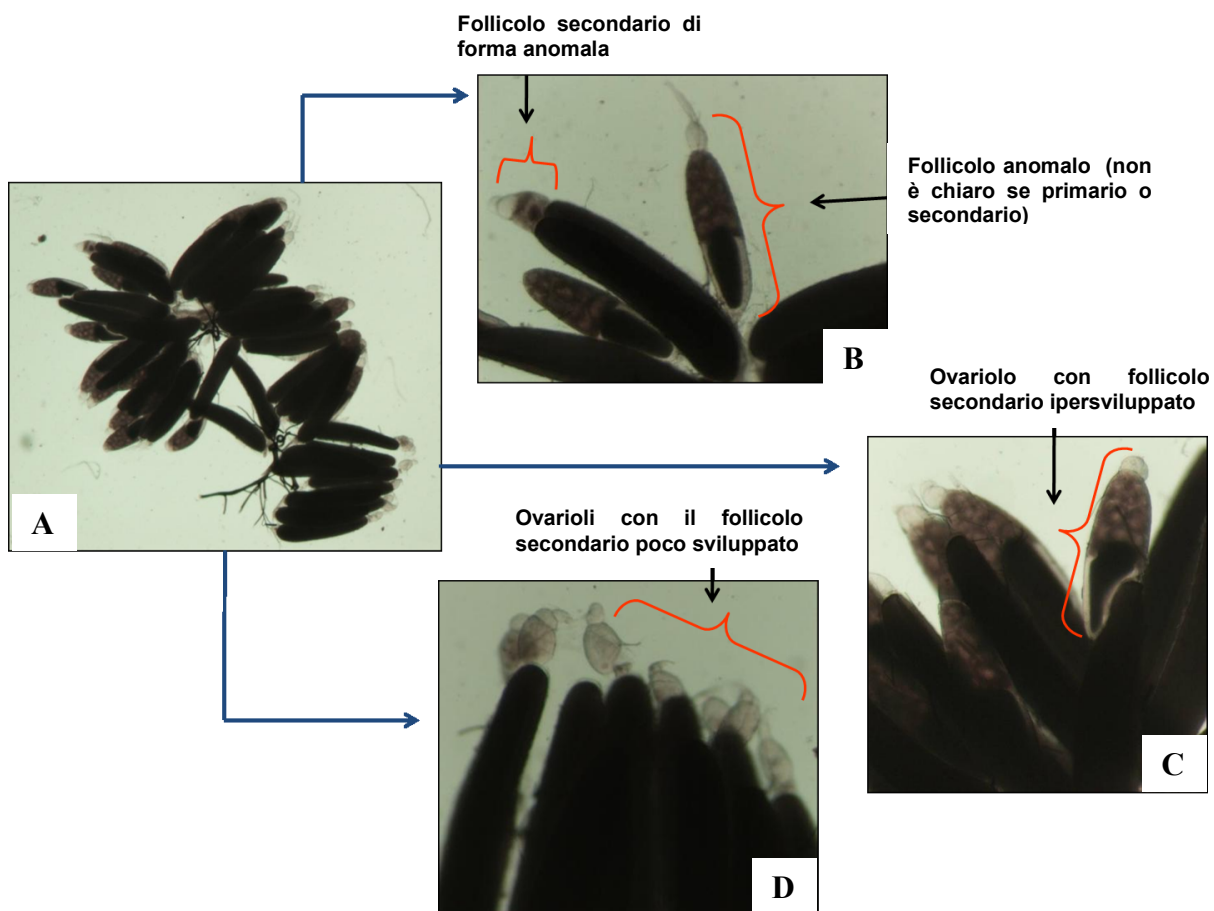


Fig. 4.9. Ovarioli trattati. A, B., C, D: varie morfologie (vedi testo).

4.5 Effetti del diofenolan sulla morfologia degli ovari

Gli esperimenti di trattamento topico con 75 µg/µl di diofenolan su femmine di *M. domestica*, eseguiti come descritto nella sezione Materiali e Metodi, hanno permesso di valutare, tramite microscopia ottica (a fresco ed in resina) e microscopia elettronica (TEM) effetti a carico degli ovari, e più precisamente a carico dei singoli ovariole a 15 (T0), 45 (T1), 70 (T2) e 90 ore (T3) dallo sfarfallamento. I quadri morfologici osservati sono illustrati nei paragrafi seguenti.

4.5.1 Morfologia generale dell'ovario

L'ovario delle femmine trattate e delle femmine di controllo è circondato da una lamina peritoneale costituita da un singolo strato di cellule ed è attraversato da una fitta rete di trachee e tracheole, intimamente associate con la guaina epiteliale che avvolge ogni singolo ovariole. Questa guaina, costituita anch'essa da un sottile strato di cellule, comprende anche cellule muscolari. Sia il germario sia i follicoli che costituiscono il vitellario sono circondati da una tunica propria (Fig. 4.10A-C).

4.5.2 Ovariole

I dettagli morfologici riguardanti i singoli ovariole sono illustrati in base ai diversi tempi di prelievo a partire dallo sfarfallamento.

T0 (sfarfallamento)

L'ovariole al momento dello sfarfallamento è composto dal germario e da un vitellario, a sua volta costituito da un solo follicolo (Tab. 4.4) (Fig. 4.10D).

Germario. È posto all'estremità anteriore dell'ovariole, ha forma a fuso (Fig. 4.10E-I), un'area complessiva di $2.4 \pm 0.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ed al suo interno sono individuabili tre regioni:

- regione 1: contiene gli oogoni e i cistoblasti (Fig. 4.10F).
- regione 2: contiene cisti germinali ed è delimitata da cellule mesodermiche con comportamento invasivo, che vanno a costituire un mesoderma prefollicolare in grado di creare un confine tra la regione 1 e la 2 (Fig. 4.10G).
- regione 3: è facilmente identificabile grazie alla cisti germinale di forma sferica e a cellule a nuclei sferici, di dimensioni maggiori rispetto a quelle delle regioni 1 e 2. Inoltre la cisti germinale è circondata alla base e ai lati da uno strato di cellule follicolari che inizia ad assumere un aspetto cuboidale (Fig. 4.10H).

L'estremità anteriore del germario è collegata ad un filamento terminale di forma cilindrica. Il filamento è formato da circa 12 cellule impilate le une sulle altre, con nuclei appiattiti in senso dorso-ventrale ed una orientazione perpendicolare rispetto all'asse longitudinale dell'ovariole (Fig. 4.10E).

Il germario è posteriormente in connessione con il vitellario tramite un peduncolo interfollicolare di forma cilindrica, formato da 5-8 cellule di origine somatica, impilate e appiattite (Fig. 4.10I). Il peduncolo interfollicolare funge inoltre da collegamento tra i vari follicoli, mutando il proprio aspetto e appiattendosi mano a mano che i follicoli procedono nello sviluppo.

Follicolo primario. Ha una forma sferica ed area di $3.6 \pm 0.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. E' delimitato da uno strato uniforme di cellule follicolari ad aspetto cuboidale. In base all'aspetto del nucleo all'interno della camera follicolare si possono distinguere due tipologie cellulari, le cellule nutrici e l'oocita.

Le cellule nutrici sono localizzate nella parte anteriore della camera follicolare e possiedono nuclei eucromatici grandi e sferici, con eterocromatina condensata irregolarmente in bande. L'oocita si trova invece nella zona posteriore della camera follicolare e presenta anch'esso un grande nucleo di forma sferica con la cromatina che inizia ad organizzarsi nel cariosoma. Il confine tra le cellule nutrici e l'oocita è ben definito per evidenti spazi intercellulari (Fig. 4.10J).

Germario	Follicolo primario
Area totale	Area totale
$2.4 \pm 0.3 \times 10^3$	$3.6 \pm 0.7 \times 10^3$

Tabella 4.4. Area totale media \pm DS (deviazione standard) in μm^2 di ovarioli (n = 179) provenienti da femmine appena sfarfallate dal pupario.

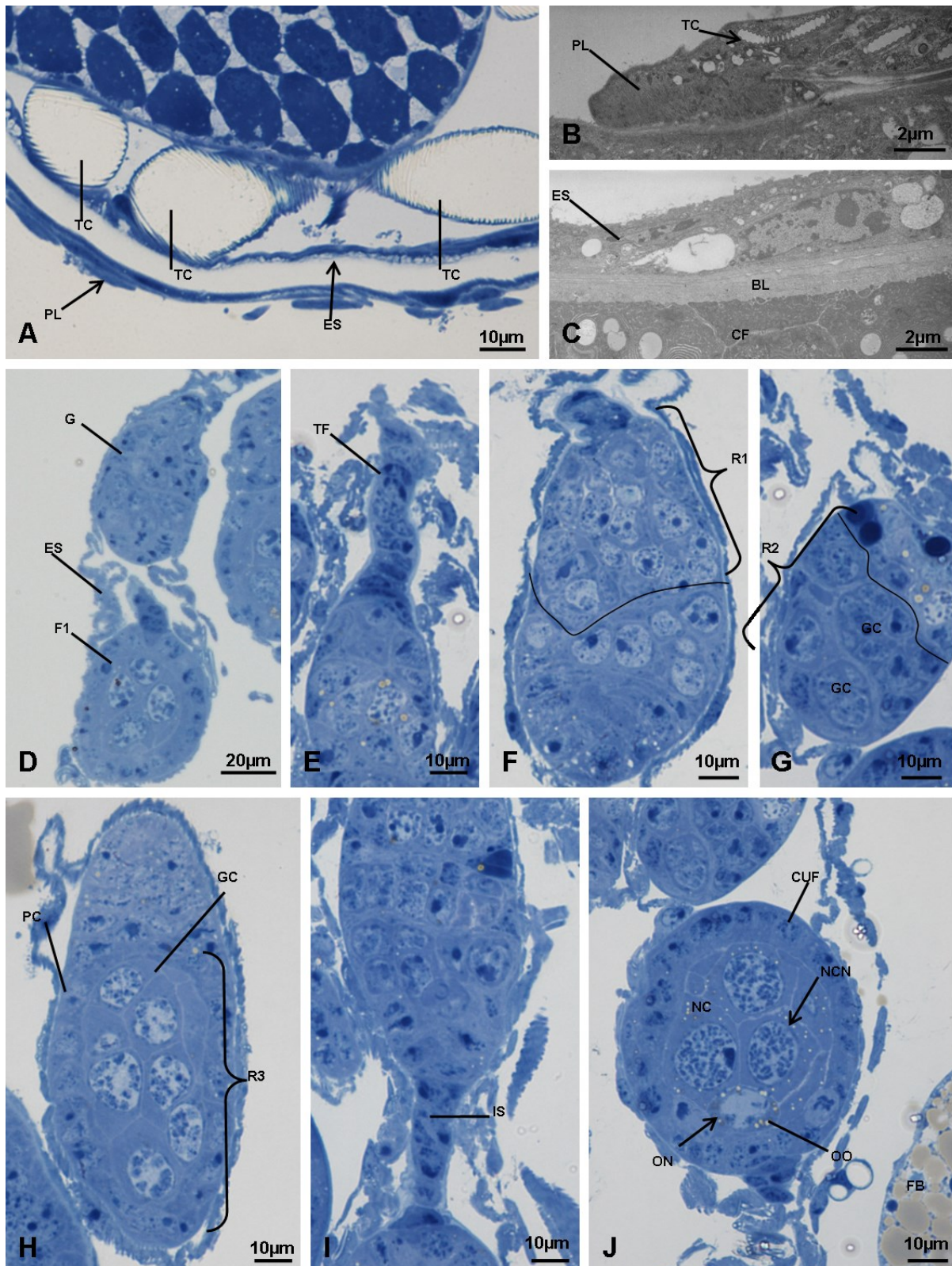


Fig. 4.10. [A] Immagine al microscopio ottico della lamina peritoneale e della guaina epiteliale di un ovario. [B-C] Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). [B] Dettaglio edlla lamina peritoneale. [C] Dettaglio della guaina epiteliale. [D-J] Immagini al microscopio ottico. [D] Ovario *in toto* al tempo T0. [E-I] Sezioni del germario al tempo T0, a partire dal filamento terminale fino al peduncolo interfollicolare. [J] Follicolo primario *in toto*. TC: trachee/tracheole; PL: lamina peritoneale; ES: guaina epiteliale; BL: lamina basale; CF: cellule follicolari G: germario; F1: follicolo primario; F2: follicolo secondario; TF: filamento terminale; R1, R2, R3: regioni del germario; GC: cisti germinale; PC: cellule prefollicolari; IS: peduncolo interfollicolare; NC: cellule nutrici; NCN: nuclei delle cellule nutrici; CUF: cellule follicolari cuboidali; OO: oocita; ON: nucleo dell'oocita; FB: corpi grassi.

T0P (15 ore dallo sfarfallamento, trattamento topico)

L'ovariolo a 15 ore dallo sfarfallamento, ovvero al momento del trattamento topico, è costituito dal germario e da un vitellario, a sua volta composto da due follicoli, uno primario ed uno secondario (Fig. 4.11A). Il follicolo primario è situato all'estremità posteriore dell'ovariolo mentre quello secondario si trova tra il follicolo primario ed il germario (Tabella 4.5).

Germario. Ha area $2.5 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la stessa morfologia osservata al tempo T0 (sfarfallamento).

Follicolo secondario. La sua area è $3.9 \pm 0.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la sua morfologia è simile a quella riscontrata nel follicolo primario al tempo T0 (Fig. 4.11B).

Follicolo primario. Ha area $34.6 \pm 2.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, forma ellissoidale e dimensioni circa otto volte superiori a quelle del follicolo al tempo T0 (Fig. 4.11A). A 15 ore dallo sfarfallamento il follicolo primario è in evidente vitellogenesi, poiché nell'oocita, localizzato nella regione posteriore, è già presente un accumulo di vitello, chiaramente visibile sia a fresco, per il colore marrone scuro, sia in resina, per una colorazione chiara e abbondante presenza di goccioline lipidiche. L'oocita occupa il 7.5% dell'area totale dell'intera camera follicolare ed è dotato di un nucleo posto lateralmente, di dimensioni più piccole rispetto a quello delle cellule nutrici e con i cromosomi addensati in un cariosoma (Fig. 4.11A,C). Le cellule follicolari che delimitano lateralmente e anteriormente la camera follicolare presentano ancora una morfologia cuboidale, mentre quelle della zona di contatto con l'oocita iniziano ad assumere un aspetto colonnare. L'area delle cellule follicolari non è stata misurata a causa delle ridotte dimensioni, quindi il valore percentuale è stato ottenuto per differenza (Fig. 4.11A, C, D).

Le cellule nutrici, situate nella parte anteriore della camera follicolare, occupano l'85% dell'intera area e sono caratterizzate da nuclei eucromatici rotondeggianti, di notevoli dimensioni ed a margini irregolari, con eterocromatina addensata in piccole zolle ed un nucleolo a ridosso dell'involucro nucleare (Fig. 4.11D).

Germario	Follicolo secondario	Follicolo primario			
Area totale	Area totale	Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$2.5 \pm 0.4 \times 10^3$	$3.9 \pm 0.5 \times 10^3$	$34.6 \pm 2.5 \times 10^3$	Cellule nutrici	$29.6 \pm 2.4 \times 10^3$	85
			Oocita	$2.6 \pm 0.4 \times 10^3$	7.5
			Cellule follicolari	----	7.5

Tabella 4.5. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovariole ($n = 181$) provenienti da ovari di femmine 45 ore dopo lo sfarfallamento. (a) Percentuali di area occupate dalle componenti del follicolo. L'area delle cellule follicolari non è stata misurata direttamente a causa delle ridotte dimensioni ed il valore percentuale è stato ottenuto sottraendo l'area delle cellule nutrici e quella dell'oocita dall'area totale del follicolo (vedi testo).

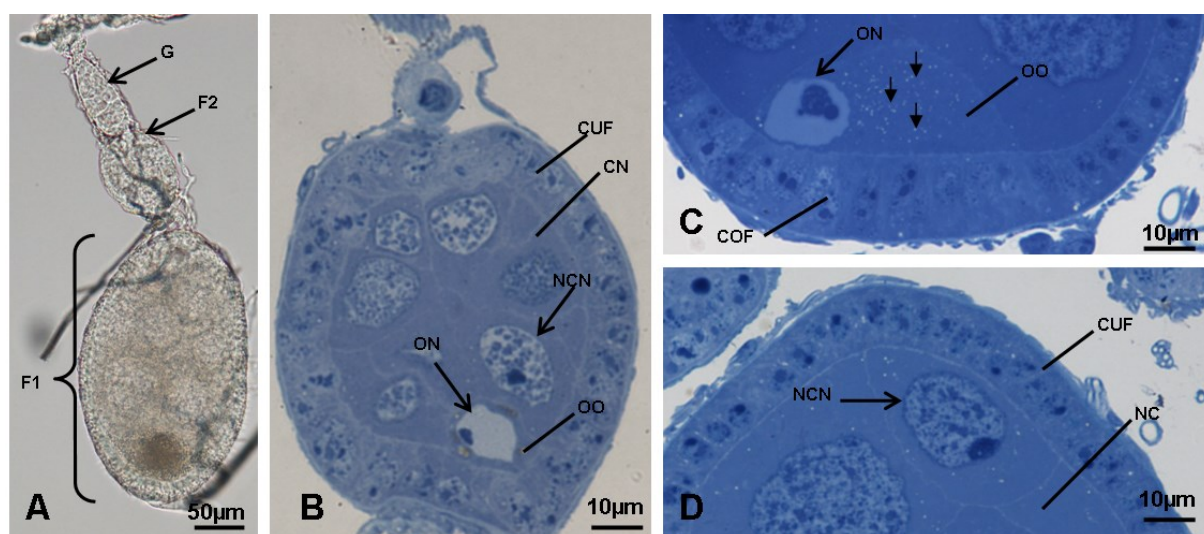


Fig. 4.11. [A] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariole *in toto* al tempo T0P. [B-D] Sezioni di ovariole al tempo T0P. [B] Follicolo secondario. [C] Dettaglio della regione posteriore del follicolo primario. Le frecce indicano alcune goccioline lipidiche. [D] Dettaglio della regione anteriore del follicolo primario. COF: cellule follicolari colonnari. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10.

T1 (45 ore dallo sfarfallamento e 30 ore dal trattamento)

Controllo

L'ovariolo a 45 ore dallo sfarfallamento appare costituito dal germario e da un vitellario, composto a sua volta da tre follicoli, uno primario, uno secondario ed uno terziario (Tabella 4.6) (Fig. 4.12A).

Germario. Ha area $2.7 \pm 0.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la stessa morfologia riscontrata nel germario al tempo T0 (sfarfallamento).

Follicolo terziario. Ha area $3.8 \pm 0.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, forma sferica ed è in evidente previtellogenesi, poiché non è possibile distinguere l'oocita dalle altre cellule per la mancanza del suo caratteristico nucleo e per l'assenza di vitello. All'interno della camera follicolare sono evidenti solo cellule con nuclei rotondeggianti, un nucleolo ben visibile ed eterocromatina organizzata in zolle di dimensioni variabili. Il follicolo è delimitato da cellule ad aspetto cuboidale (Fig. 4.12B).

Follicolo secondario. Ha area $15.8 \pm 2.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e forma ellissoidale, ed è delimitato da uno strato uniforme di cellule follicolari ad aspetto cuboidale i cui nuclei possiedono una cromatina distribuita irregolarmente ed un evidente nucleolo. All'interno della camera follicolare si possono distinguere due tipologie cellulari, le cellule nutrici e l'oocita. Le cellule nutrici, localizzate nella parte anteriore della camera follicolare, occupano complessivamente il 90% dell'area totale del follicolo e possiedono grandi nuclei sferici a contorno irregolare, eterocromatina addensata in piccoli grumi e un nucleolo localizzato a ridosso dell'involucro nucleare. L'oocita occupa solamente il 5.1% dell'area totale del follicolo ed il suo citoplasma è caratterizzato da goccioline lipidiche, che indicano che il follicolo è in vitellogenesi; nel nucleo è possibile individuare cromosomi addensati in un cariosoma (Fig. 4.12C).

Follicolo primario. Ha area $239 \pm 21 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e una forma ellissoidale in cui l'asse maggiore corrisponde alla direzione antero-posteriore del follicolo. Il follicolo si trova in piena vitellogenesi e l'oocita, localizzato posteriormente, occupa il 41.8% dell'area totale mentre le cellule nutrici ne occupano il 46.4% (Fig. 4.12A).

A 45 ore dallo sfarfallamento le cellule follicolari hanno un elevato grado di differenziamento ed i tipi cellulari sono rappresentati da cellule follicolari squamose, cellule follicolari colonnari, cellule follicolari centripete e "border cell cluster".

- Cellule follicolari squamose: hanno un aspetto appiattito e costituiscono un epitelio che delimita il follicolo a livello delle cellule nutrici; le cellule follicolari squamose sono caratterizzate da nuclei posti in invaginazioni al punto di contatto con le cellule nutrici, ciascuno con un nucleolo di notevoli dimensioni (Fig. 4.12D).

- Cellule follicolari colonnari: queste cellule, dette in inglese “mainbody cells”, formano un epitelio colonnare con ampi spazi intercellulari ai lati e alla base dell’oocita; sono dotate di un nucleo e di un grande nucleolo, come le cellule follicolari squamose (Fig. 4.12E).
- Cellule follicolari centripete: sono cellule che si insinuano nell’interfaccia cellule nutrice-oocita, prendendo contatto con le border cell cluster e determinando una separazione tra il comparto delle cellule nutrici e l’oocita (Fig. 4.12F).
- Border cell cluster: è un gruppo di circa 10 cellule di forma discoidale, provenienti dal polo anteriore del follicolo, che si posizionano a livello dell’interfaccia cellule nutrice-oocita tramite un processo migratorio. Come precedentemente menzionato, questo gruppo di cellule prende contatto con le cellule follicolari centripete (Fig. 4.12G).

L’oocita, oramai delimitato ai lati e posteriormente dall’epitelio follicolare cilindrico ed anteriormente dalle cellule centripete e dal border cell cluster, presenta un vitello ricco di sfere di tuorlo di dimensioni variabili e goccioline lipidiche. Il nucleo ha una forma sferica con il cariosoma ancora più compatto rispetto allo stadio precedente e, sparsi nel nucleoplasma, si possono individuare alcuni frammenti nucleari (Fig. 4.12A, H)..

Le cellule nutrici hanno margini ben definiti per la presenza di ampi spazi intercellulari, un citoplasma ricco di goccioline lipidiche, uniformemente distribuite. I nuclei di queste cellule sono di notevoli dimensioni, hanno margine frastagliato ed eterocromatina addensata in ammassi di forma irregolare e dimensioni variabili (Fig. 4.12A, I).

Germario (Area totale)			
$2.7 \pm 0.9 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
$3.8 \pm 0.8 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$15.8 \pm 2.1 \times 10^3$	Cellule nutrici	$14.3 \pm 1.9 \times 10^3$	90
	Oocita	$0.8 \pm 0.2 \times 10^3$	5.1
	Cellule follicolari	---	4.9
Follicolo primario			
Area totale	Area delle singole componenti		%
$239 \pm 21 \times 10^3$	Cellule nutrici	$111 \pm 10 \times 10^3$	46.4
	Oocita	$100 \pm 12 \times 10^3$	41.8
	Cellule follicolari	----	11.8

Tabella 4.6. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 175) in ovari di femmine di controllo, 45 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come indicato in Tabella 4.5.

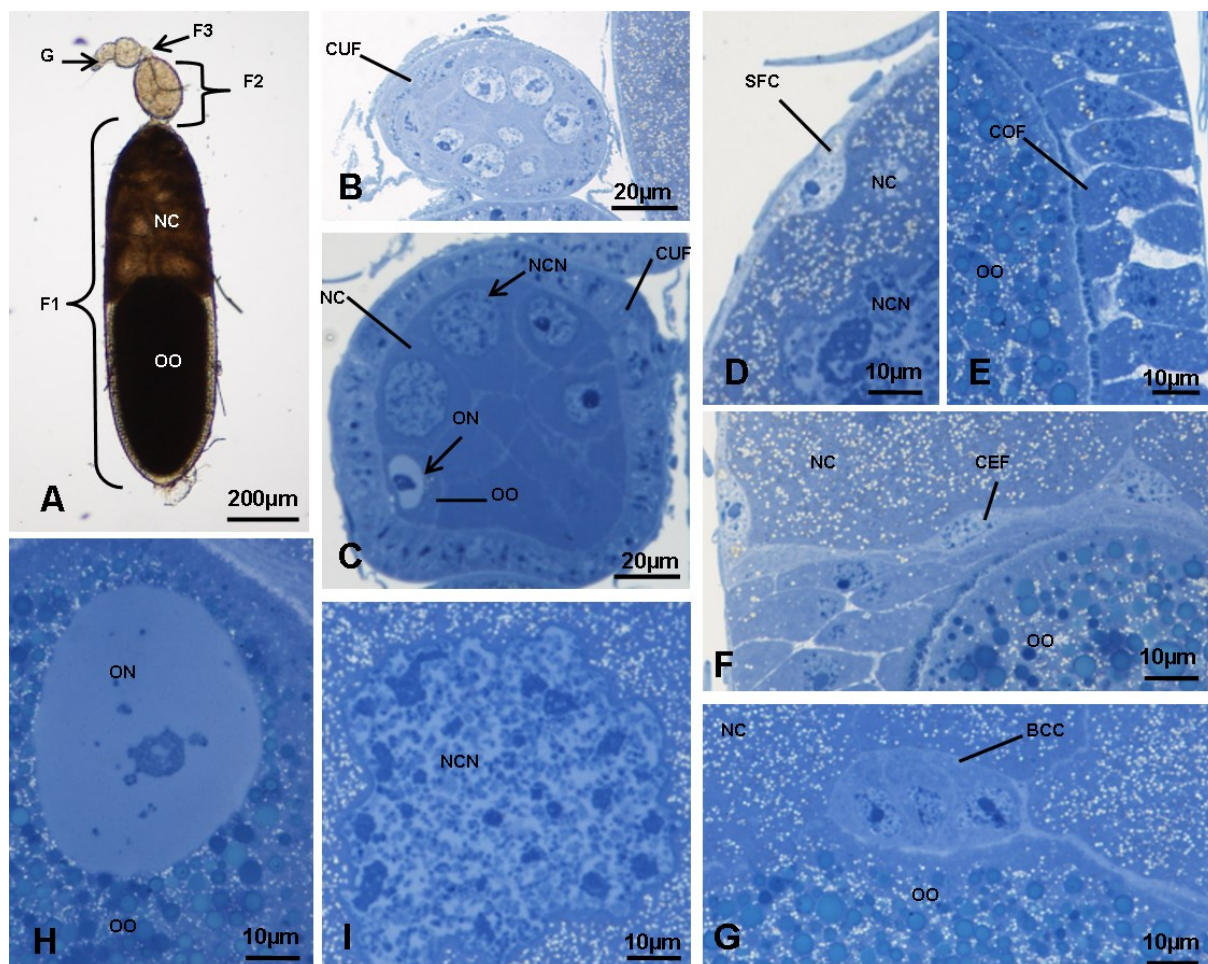


Fig. 4.12. Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* di una femmina di controllo al tempo T1. [B-I] Sezioni di ovarioli di controllo al tempo T1. [B] Follicolo terziario. [C] Follicolo secondario. [D-I] Follicolo primario. [D] Interfaccia tra cellule nutrici e cellule follicolari squamose. [E] Cellule follicolari colonnari. [F] Interfaccia tra oocita, cellule nutrici e cellule centripete. [G] "Border cell cluster". [H] Nucleo dell'oocita. [I] Nucleo di una cellula nutrice. F3: follicolo terziario; SFC: cellule follicolari squamose; CEF: cellule follicolari centripete; BCC: border cells cluster. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10 e 4.11.

Trattato (tempo T1, 45 ore dallo sfarfallamento e 30 ore dal trattamento)

Dopo 45 ore dallo sfarfallamento e 30 ore dal trattamento sono stati evidenziati due morfotipi di ovariole, denominati morfotipo 1 e 2. Il morfotipo 2 è a sua volta caratterizzato da due varianti (2A e 2B) in base a differenze nel follicolo secondario, non visibili in microscopia ottica a fresco.

Morfotipo 1

L'ovariole, composto dal germario e da due follicoli (primario e secondario) (Tabella 4.7), si caratterizza per il follicolo primario in degenerazione ed il follicolo terziario ancora adeso al germario (Fig. 4.13A).

Germario. Posto all'estremità anteriore dell'ovariole, ha area $3.3 \pm 0.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ed una morfologia simile a quella riscontrata al tempo T0 (Fig. 4.13B).

Follicolo secondario. Ha area $18.4 \pm 9.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, una forma ellissoidale ed è delimitato da uno strato uniforme di cellule follicolari ad aspetto cuboidale (Fig. 4.13C). Il suo aspetto è molto simile a quello del follicolo secondario del controllo al tempo T1 ed anche in questo caso si individuano all'interno della camera follicolare due tipologie cellulari, le cellule nutrici e l'oocita. Le cellule nutrici, localizzate nella parte anteriore della camera follicolare, occupano complessivamente il 91.8% dell'area totale del follicolo e possiedono grandi nuclei eucromatici, di forma sferica a contorno irregolare, eterocromatina addensata in piccoli grumi ed un nucleolo ben evidente, localizzato centralmente o a ridosso dell'involucro nucleare.

L'oocita è caratterizzato da un citoplasma ricco di goccioline lipidiche, che indica l'entrata del follicolo nella vitellogenesi, e da un nucleo nel quale è possibile individuare i cromosomi addensati in un cariosoma. In questo follicolo l'oocita occupa solo il 3.5% dell'area totale.

Follicolo primario. Rispetto alla situazione riscontrata nel controllo al tempo T1, nella quale il follicolo primario si trovava in piena vitellogenesi con l'oocita che occupava il 41.7 % dell'area dell'intera camera follicolare, il follicolo primario del morfotipo 1 non presenta nessuna delle caratteristiche precedentemente citate: appare infatti completamente degenerato e costituito da una masserella allungata di cellule, con area $13.9 \pm 2.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, localizzata all'interno della guaina epiteliale (Fig. 4.13D)

Germario (Area totale)			
$3.3 \pm 0.3 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$18.4 \pm 9.4 \times 10^3$	Cellule nutrici	$16.9 \pm 9.1 \times 10^3$	91.8
	Oocita	$0.6 \pm 0.1 \times 10^3$	3.3
	Cellule follicolari	---	4.5
Follicolo primario (Area totale)			
$13.9 \pm 2.4 \times 10^3$			

Tabella 4.7. Morfotipo 1. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 16) in ovari di femmine trattate, 45 ore dopo sfarfallamento; (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

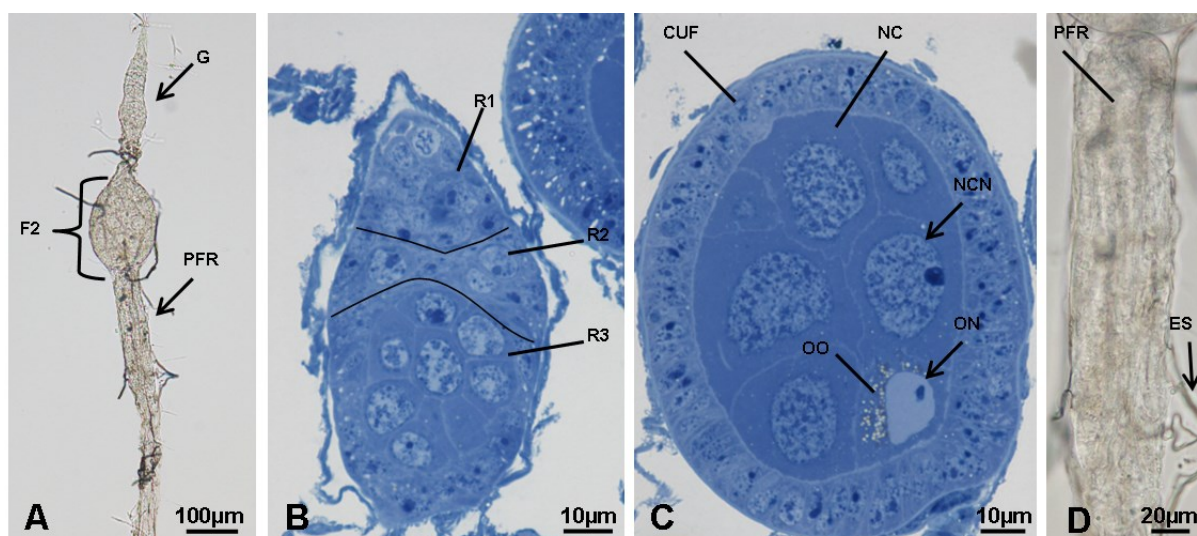


Fig. 4.13. [A-D] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovario *in toto* al tempo T1, morfotipo 1. [B] Sezione del germario in un ovario di morfotipo T1. [C] Follicolo secondario di un ovario di morfotipo 1. [D] Residuo del follicolo primario in un ovario di morfotipo 1. PFR: residuo del follicolo primario. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10 e 4.11.

Morfotipo 2

Dopo 45 ore dallo sfarfallamento e 30 ore dal trattamento, l'ovariolo in microscopia ottica a fresco (Tabella 4.8) appare del tutto simile a quello delle femmine di controllo della stessa età: è composto da un germario e due follicoli (primario e secondario) (Fig. 4.14A).

Tuttavia le osservazioni in microscopia ottica in resina hanno evidenziato due quadri morfologici differenti, denominati variante A e variante B. Di seguito sono descritte le caratteristiche comuni del germario e del follicolo primario riscontrate negli ovarioli delle due varianti, mentre per quanto riguarda il follicolo secondario sono descritti gli elementi caratterizzanti in base ai quali è possibile distinguere le due varianti.

Germario. Posizionato all'estremità anteriore dell'ovariolo, area di $3.9 \pm 0.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e morfologia simile a quella riscontrata al tempo T0.

Follicolo secondario. Ha area complessiva $17.8 \pm 14 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, con le cellule nutrici che occupano il 91.3% della struttura, mentre l'oocita, da poco entrato in vitellogenesi, ne occupa solamente il 3.4%. Le varianti A e B sono distinte in base alle caratteristiche del follicolo secondario:

- variante A: questo follicolo presenta le stesse caratteristiche riscontrate nel follicolo secondario del controllo al tempo T1 (Fig. 4.14B);
- variante B: questo follicolo si distingue dalla variante A e dal controllo al tempo T1 per la colorazione maggiormente intensa del citoplasma sia nelle cellule nutrici sia nell'oocita, e per la presenza di addensamenti scuri di dimensioni variabili nelle cellule follicolari. Questi quadri morfologici potrebbero indicare una iniziale degenerazione (Fig. 4.14C).

Follicolo primario. Ha area $254 \pm 21 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e forma ellissoidale, con l'asse maggiore che corrisponde alla direzione antero-posteriore del follicolo (Fig. 4.14A). Il quadro morfologico è del tutto simile a quello riscontrato nel follicolo primario del controllo al tempo T1, con l'oocita che occupa il 53.1% dell'area totale del follicolo e con le sovrastanti cellule nutrici che ne occupano il 35.8%. Come nel controllo al medesimo intervallo di prelievo, le cellule follicolari si distinguono nelle quattro tipologie precedentemente riportate: cellule follicolari squamose, cellule follicolari colonnari, cellule follicolari centripete, border cell cluster.

Germario (Area totale)			
$3.9 \pm 0.3 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$17.8 \pm 1.4 \times 10^3$	Cellule nutrici	$16.3 \pm 1.4 \times 10^3$	91.3
	Oocita	$0.6 \pm 0.1 \times 10^3$	3.4
	Cellule follicolari	---	5.2
Follicolo primario			
Area totale	Area delle singole componenti		%
$254 \pm 21 \times 10^3$	Cellule nutrici	$91 \pm 8.5 \times 10^3$	35.8
	Oocita	$135 \pm 17 \times 10^4$	53.1
	Cellule follicolari	----	11.1

Tabella 4.8. Morfotipo 2. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 155) in ovari di femmine trattate, 45 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

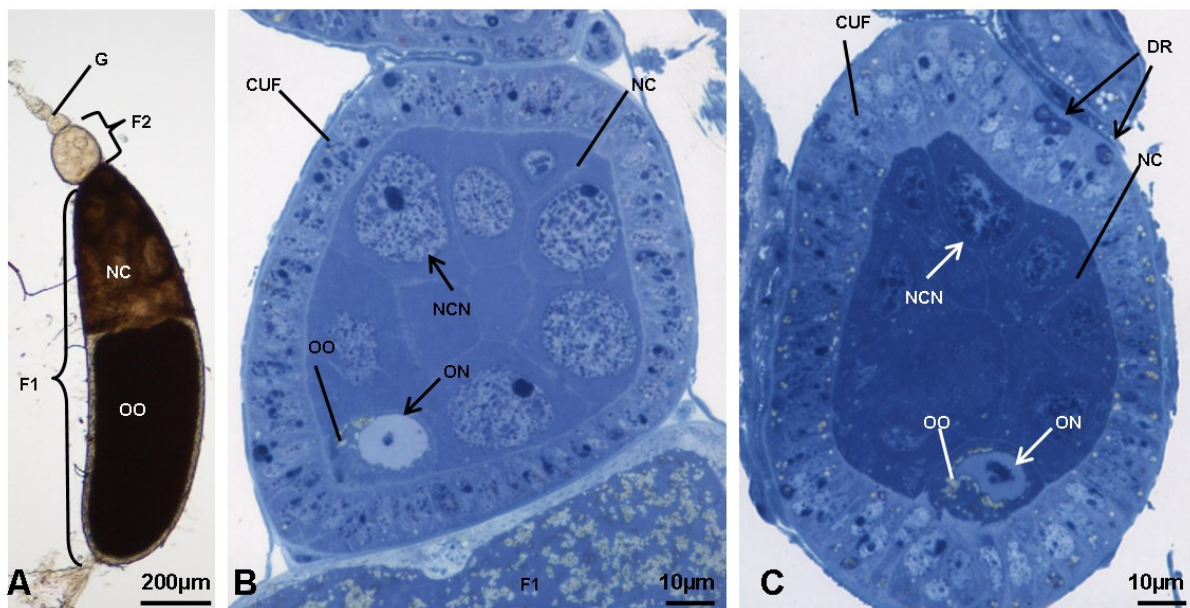


Fig. 4.14. Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* al tempo T1, morfotipo 2. [B] Sezione del follicolo secondario in un ovario di morfotipo 2, variante A. [C] Sezione del follicolo secondario in un ovario di morfotipo 2, variante B. DR: regioni scure. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10 e 4.11.

T2 (70 ore dallo sfarfallamento e 55 ore dal trattamento)

Controllo

Gli ovari appartenenti alle femmine di controllo a 70 ore dallo sfarfallamento presentano ovarioli composti da un germario e tre follicoli (primario, secondario e terziario) (Tabella 4.9) (Fig. 4.15A).

Germario. Ha area $2.6 \pm 0.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la stessa morfologia riscontrata nel germario al tempo T0.

Follicolo terziario. Ha area $3.8 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e morfologia e grado di sviluppo simile a quelli osservati nel follicolo terziario al tempo T1.

Follicolo secondario. Ha area $32.4 \pm 3.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, forma ellissoidale e morfologia simile a quella del follicolo primario al tempo T0P. Il follicolo secondario è caratterizzato da evidenti segni di vitellogenesi, poiché l'oocita, localizzato nella regione posteriore, è caratterizzato dalla presenza di goccioline lipidiche. Le cellule follicolari situate lateralmente ed anteriormente alla camera follicolare hanno mantenuto la caratteristica di epitelio cuboidale, mentre all'interfaccia oocita-cellule follicolari iniziano ad assumere un aspetto colonnare (Fig. 4.15B, C) Le cellule nutrici, caratterizzate da nuclei rotondeggianti di notevoli dimensioni a margini irregolari e da eterocromatina addensata in piccoli grumi ed un grande nucleolo, sono poste nella parte anteriore della camera follicolare, di cui occupano il 78.4% (Fig. 4.15C). L'oocita occupa solo il 7.1% dell'area totale e possiede un nucleo, posto lateralmente, di dimensioni più piccole rispetto a quello delle cellule nutrici, con i cromosomi addensati in un cariosoma e frammenti nucleolari (Fig. 4.15B).

Follicolo primario. Ha area $341 \pm 49 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, ed ormai completamente occupato dall'oocita poiché il comparto delle cellule nutrici è completamente degenerato. Nell'oocita sono individuabili tre principali regioni: il citoplasma ricco di vitello (ooplasma), la membrana vitellina ed il corion. La massa dell'ooplasma, delimitata dalla membrana vitellina che appare come una sottile pellicola, occupa tutto il volume interno dell'oocita. In questa massa è possibile identificare numerose goccioline lipidiche e altre goccioline, di dimensioni variabili ma sempre maggiori di quelle lipidiche, probabilmente a contenuto proteico (Fig. 4.15D,E) Il nucleo non è più individuabile perché l'involucro nucleare si è dissolto, liberando il cariosoma nell'ooplasma. Il corion è chiaramente visibile.

Come le cellule nutrici, anche le cellule follicolari vanno incontro ad un processo degenerativo, trasformandosi, lateralmente e posteriormente all'oocita, in un sottile strato di cellule e anteriormente (soprattutto in prossimità della zona di contatto con il follicolo secondario) in una massa di cellule senza una precisa disposizione e nuclei con forme e

dimensioni variabili. Una volta avvenuta la deposizione delle uova, le cellule follicolari e la guaina epiteliale andranno a costituire il corpo luteo (Fig. 4.15F)..

Germario (Area totale)			
$2.6 \pm 0.7 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
$3.8 \pm 0.4 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$32.4 \pm 3.1 \times 10^3$	Cellule nutrici	$25.4 \pm 4.3 \times 10^3$	78.4
	Oocita	$2.3 \pm 0.5 \times 10^3$	7.1
	Cellule follicolari	---	14.5
Follicolo primario (Area totale)			
$341 \pm 49 \times 10^3$			

Tabella 4.9. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovariole (n = 177) in ovari di femmine di controllo, 70 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

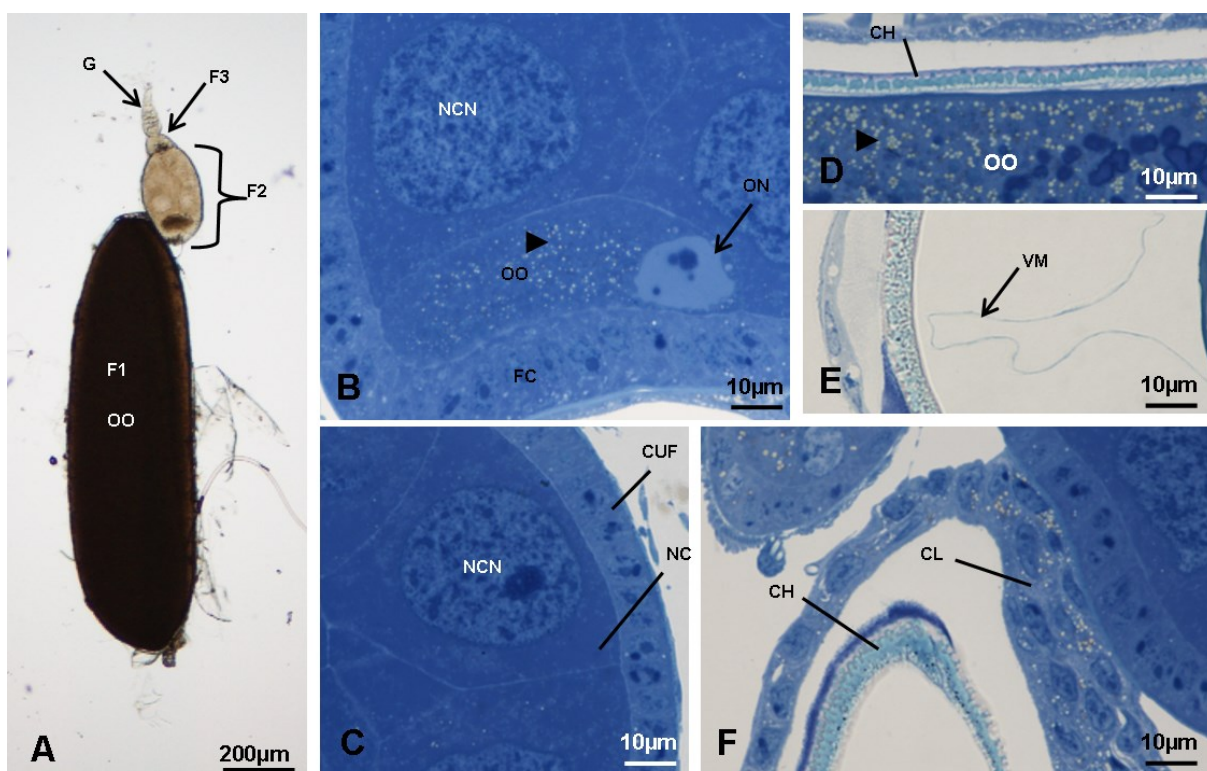


Fig. 4.15. Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariole *in toto* di una femmina di controllo al tempo T2. [B-F] Sezioni di ovariole di femmine di controllo al tempo T2. [B] Dettaglio della regione posteriore del follicolo secondario. [C] Dettaglio della regione anteriore laterale del follicolo secondario. [D] Dettaglio del follicolo primario che mostra il corion e l'ooplasma. [E] Dettaglio del follicolo primario che mostra il corion e la membrana vitellina. [F] Dettaglio della regione anteriore del follicolo primario. Freccia triangolare: goccioline lipidiche; CH: corion; VM: membrana vitellina; CL: cellule che formeranno il corpo luteo. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11 e 4.12.

Trattato (tempo T2, 70 ore dallo sfarfallamento e 55 ore dal trattamento)

Di seguito sono descritti i tre morfotipi (denominati 3, 4 e 5) evidenziati negli ovari di femmine trattate a 70 ore dallo sfarfallamento.

Morfotipo 3

Ogni ovariole è composto dal germario e da tre follicoli (primario, secondario e terziario) (Fig. 4.16A), la cui morfologia complessiva è del tutto simile a quella degli ovariole di controllo al tempo T2, ad eccezione del follicolo secondario che presenta un maggiore grado di sviluppo (Tabella 4.10).

Germario. Posto all'estremità anteriore dell'ovariole, ha area $2.1 \pm 0.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e morfologia del tutto simile a quella riscontrata al tempo T0.

Follicolo terziario. Dopo 70 ore dallo sfarfallamento questo follicolo ha area $3.4 \pm 0.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e in esso, a differenza del controllo al tempo T2, è possibile individuare un inizio di differenziamento dell'oocita, per una maggiore concentrazione di goccioline lipidiche e per la presenza del cariosoma nel nucleo (Fig. 4.16B).

Follicolo secondario. Ha area $44.1 \pm 9.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e forma ellissoidale, con la parte posteriore variamente deformata al contatto con il follicolo primario (Fig. 4.16C). Come per il controllo al tempo T2, le cellule nutrici sono localizzate nella zona anteriore del follicolo e occupano il 76.6% dell'intera camera follicolare, mentre l'oocita, localizzato posteriormente, mostra evidenti segni di vitellogenesi ed occupa l'11.6% dell'intero follicolo. Le cellule follicolari, come nel controllo al tempo T2, mantengono un aspetto cuboidale a livello delle cellule nutrici ed iniziano ad assumere una conformazione colonnare alla base dell'oocita (Fig. 4.16D,E). L'unica differenza, rispetto al controllo al tempo T2, risiede nelle dimensioni notevolmente maggiori.

Follicolo primario. Ha area $307 \pm 30 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e aspetto simile a quello del controllo al tempo T2. L'oocita occupa completamente la camera follicolare e le cellule nutrici non sono più presenti a causa della loro completa degenerazione.

Germario (Area totale)			
$2.1 \pm 0.5 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
$3.4 \pm 0.5 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$44.1 \pm 9.4 \times 10^3$	Cellule nutrici	$33.8 \pm 6.5 \times 10^3$	76.6
	Oocita	$5.1 \pm 2.3 \times 10^3$	11.6
	Cellule follicolari	---	11.8
Follicolo primario (Area totale)			
$307 \pm 30 \times 10^3$			

Tabella 4.10. Morfotipo 3. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 110) in ovari di femmine trattate, 70 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

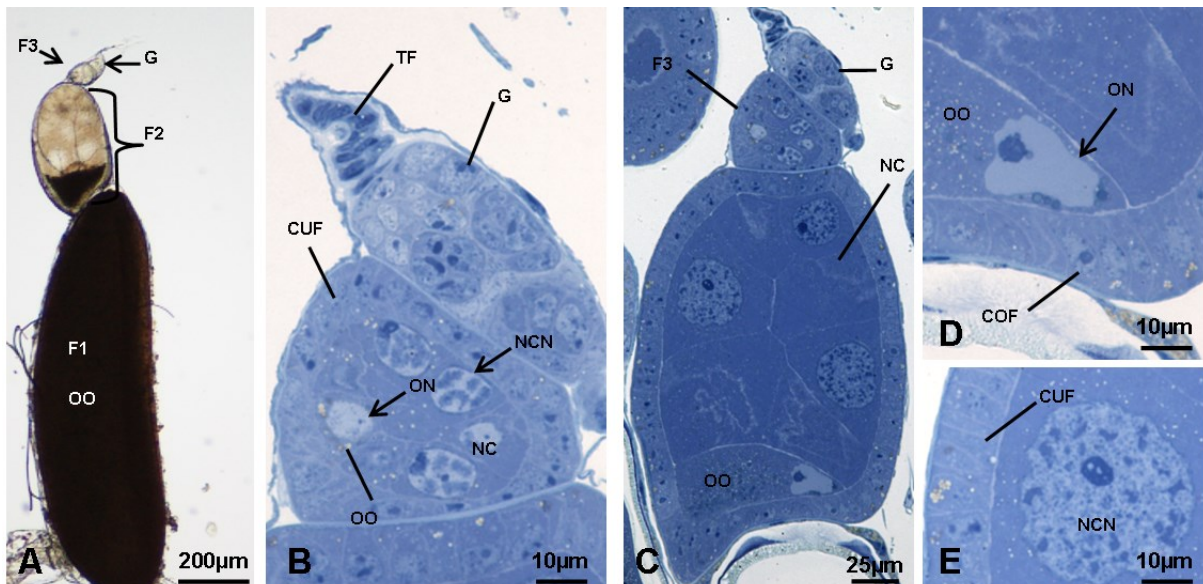


Fig. 4.16. Immagini al microscopio ottico. [A] Ovario *in toto* al tempo T2, morfotipo 3. [B-E] Sezioni di ovario al tempo T2, morfotipo 3. [B] Germario e follicolo terziario. [C] Germario, follicolo terziario e follicolo secondario. [D] Dettaglio della regione posteriore del follicolo secondario. [E] Dettaglio della regione laterale del follicolo secondario. Abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11 e 4.12.

Morfotipo 4

Ogni ovariole è composto dal germario e da tre follicoli (Tabella 4.11). L'elemento distintivo di questo morfotipo è il follicolo secondario, che mostra un quadro del tutto anomalo rispetto agli ovariole di controllo al tempo T2 (Fig. 4.17A).

Germario. Posizionato all'estremità anteriore dell'ovariole, ha area $2.4 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la sua morfologia è del tutto simile a quella riscontrata al tempo T0.

Follicolo terziario. Ha un'area di $3.8 \pm 0.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e, a differenza del controllo al tempo T2, in esso si può individuare un inizio di differenziamento dell'oocita, apprezzabile per una maggiore concentrazione di goccioline lipidiche e per la presenza del cariosoma nel nucleo (Fig. 4.17B).

Follicolo secondario. Il follicolo secondario, che caratterizza il morfotipo, è composto da una massa cellulare dove non sono identificabili le cellule tipiche di questa fase dello sviluppo (oocita, cellule nutrici e cellule follicolari). La sua area è $8.5 \pm 2.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e il follicolo sembra presentare una certa organizzazione interna, nella quale è possibile individuare uno strato corticale caratterizzato da cellule con masse scure e goccioline lipidiche ed una zona centrale, caratterizzata da un ampio accumulo di materiale scuro all'interno del quale sono riconoscibili alcuni nuclei di forma variabile (Fig. 4.17C, D). La presenza di questi elementi induce a ritenere che il follicolo sia in una fase degenerativa.

Follicolo primario. Ha area $303 \pm 28 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, come il morfotipo 3 al tempo T2, e presenta un quadro morfologico del tutto simile a quello del follicolo primario descritto nel controllo al tempo T2, in cui l'oocita occupa completamente la camera follicolare e le cellule nutrici sono completamente degenerate (Fig. 4.17A).

Germario (Area totale)	$2.4 \pm 0.4 \times 10^3$
Follicolo terziario (Area totale)	$3.8 \pm 0.5 \times 10^3$
Follicolo secondario (Area totale)	$8.5 \pm 2.6 \times 10^3$
Follicolo primario (Area totale)	$303 \pm 28 \times 10^3$

Tabella 4.11. Morfotipo 4. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 64) in ovari di femmine trattate, 70 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

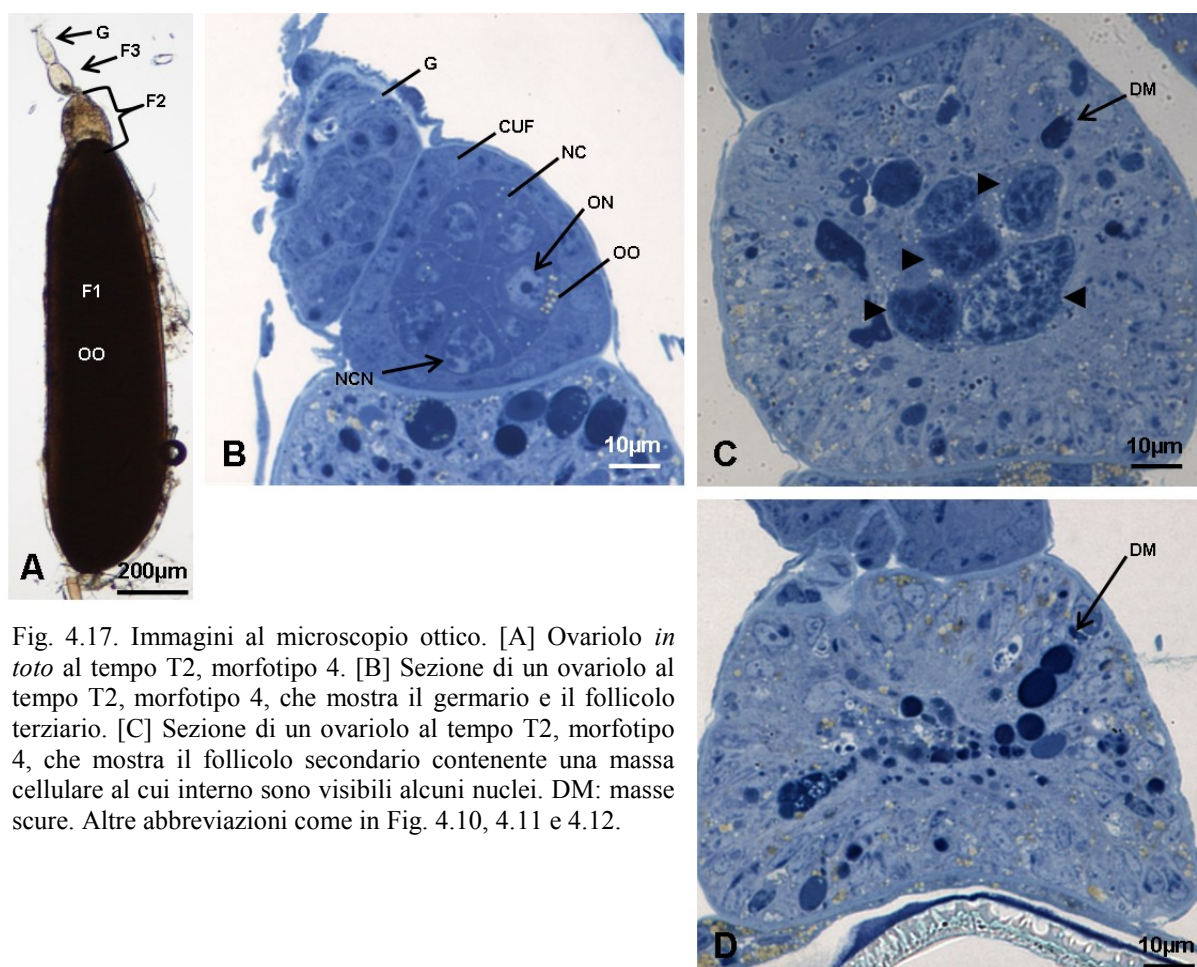


Fig. 4.17. Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* al tempo T2, morfotipo 4. [B] Sezione di un ovario al tempo T2, morfotipo 4, che mostra il germario e il follicolo terziario. [C] Sezione di un ovario al tempo T2, morfotipo 4, che mostra il follicolo secondario contenente una massa cellulare al cui interno sono visibili alcuni nuclei. DM: masse scure. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11 e 4.12.

Morfotipo 5

L'ovariolo, composto dal germario e da tre follicoli (Fig. 4.18A,B), presenta una morfologia del tutto simile al morfotipo 1 al tempo T1, con i follicoli terziario e secondario maggiormente sviluppati (Tabella 4.12).

Germario. Posto all'estremità anteriore dell'ovariolo, ha area $2.3 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la sua morfologia è del tutto simile a quella evidenziata al tempo T0.

Follicolo terziario. Dopo 70 ore dallo sfarfallamento questo follicolo ha area $3.5 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e, come per i morfotipi 3 e 4 al tempo T2, è possibile individuare un inizio di differenziamento dell'oocita, visibile per una maggiore concentrazione di goccioline lipidiche e per la presenza del cariosoma nel nucleo.

Follicolo secondario. Ha area $41.2 \pm 4.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e le sue cellule nutrici sono posizionate nella parte anteriore della camera follicolare, occupano il 79.9% della camera follicolare e sono caratterizzate da nuclei rotondeggianti eucromatici. L'oocita occupa il 10.2% dell'intera camera follicolare e presenta il nucleo organizzato nel cariosoma (Fig. 4.18C, D).

Follicolo primario. Il follicolo primario è ormai del tutto degenerato e ciò che ne rimane è solo una piccola massa ovale all'interno della guaina epiteliale (Fig. 4.18B, E).

Germario (Area totale)			
$2.3 \pm 0.4 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
$3.5 \pm 0.4 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$41.2 \pm 4.9 \times 10^3$	Cellule nutrici	$32.9 \pm 3.6 \times 10^3$	79.8
	Oocita	$4.2 \pm 0.9 \times 10^3$	10.2
	Cellule follicolari	---	10

Tabella 4.12. Morfotipo 5. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 6) in ovari di femmine trattate, 70 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

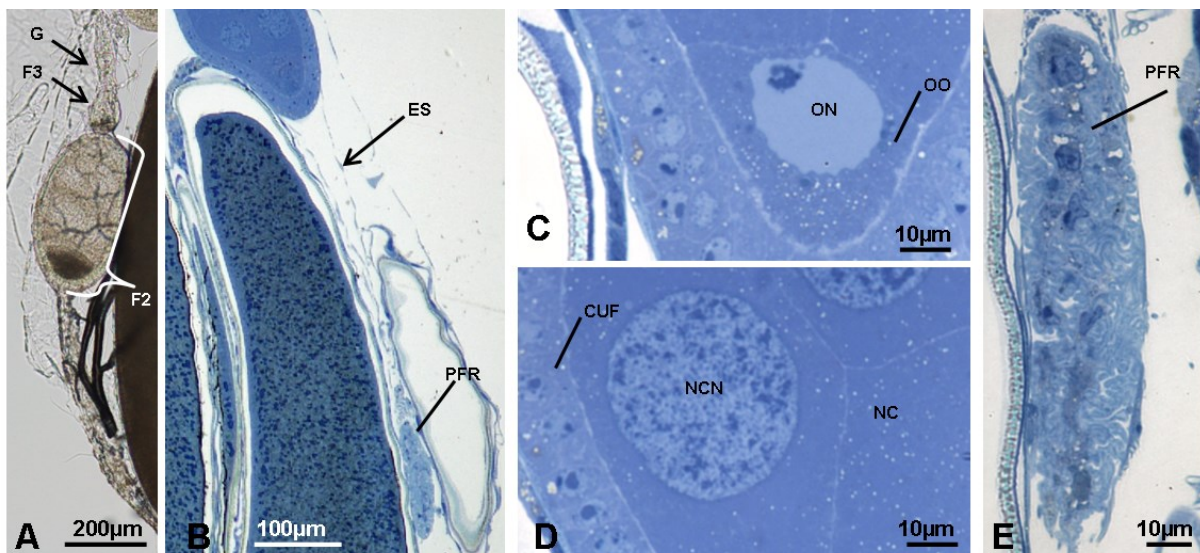


Fig. 4.18. Immagini al microscopio ottico. [A] Ovario *in toto* al tempo T2, morfotipo 5. [B-E] Sezioni di ovario al tempo T2, morfotipo 5. [B] Follicolo secondario e residui del follicolo primario. [C] Dettaglio dell'oocita del follicolo secondario. [D] Dettaglio della regione laterale del follicolo secondario. [E] Residuo del follicolo primario. Abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11 e 4.13.

T3 (90 ore dallo sfarfallamento e 75 dal trattamento)

Controllo

Gli ovari di femmine di controllo al tempo T3 mostrano ovariooli composti da un germario e da tre follicoli (Fig. 4.19A) (Tabella 4.13).

Germario. Ha area $2.3 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e presenta la stessa morfologia riscontrata al tempo T0.

Follicolo terziario. Ha area $3.9 \pm 0.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e al suo interno è possibile individuare l'oocita, di dimensioni molto simili a quelle delle cellule nutrici e caratterizzato da un citoplasma ricco di goccioline lipidiche e nucleo con cariosoma (Fig. 4.19B).

Follicolo secondario. Ha area $39.5 \pm 3.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e forma ellissoidale, variabile a seconda dello spazio disponibile (Fig. 4.19A). Al tempo T3 il follicolo secondario ha una morfologia simile a quella del follicolo secondario al tempo T2, con l'oocita che occupa l'11.8% dell'area totale del follicolo e le cellule nutrici che ne occupano il 76.7% (Fig. 4.19A, C, D).

L'ultrastruttura del follicolo secondario permette di individuare i seguenti tipi cellulari (Fig. 4.19E-I; Fig. 4.20A-E).

- Cellule follicolari cuboidali: delimitano la camera follicolare a livello delle cellule nutrici e presentano un citoplasma ricco di ribosomi sia liberi sia organizzati, con reticolo endoplasmatico quasi sempre disposto in maniera circolare, in particolare attorno a goccioline lipidiche (Fig. 4.20A, B). I mitocondri sono caratterizzati da una matrice elettrondensa.

I nuclei hanno forma rotondeggiante con nucleolo ben evidente (Fig. 4.20C). Il margine di queste cellule, a livello della tunica propria, è caratterizzato da invaginazioni che lo rendono irregolare (Fig. 4.20B). Gli spazi intercellulari tra queste cellule sono poco evidenti e l'interfaccia con le cellule nutrici è ricca di microvilli interdigitati con ridotti spazi (Fig. 4.20D).

- Cellule follicolari colonnari: localizzate alla base dell'oocita presentano un citoplasma più elettrondenso rispetto a quello delle cellule follicolari cuboidali (Fig. 4.19E), ricco di ribosomi generalmente associati ad un reticolo endoplasmatico con membrane concentriche che spesso circondano gocce lipidiche (Fig. 4.19G). I nuclei hanno una forma allungata con evidente nucleolo (Fig. 4.19E, F). Il margine di queste cellule, a livello della tunica propria, è caratterizzato da invaginazioni che conferiscono un tratto irregolare (Fig. 4.19H). Gli spazi intercellulari tra queste cellule sono ben visibili e l'interfaccia con l'oocita è ricca di microvilli interdigitali con ridotti spazi (Fig. 4.19I).

- Oocita: l'ooplasma appare elettrondenso e presenta una distribuzione eterogenea dei mitocondri che appaiono fortemente concentrati a livello dell'interfaccia cellule follicolari-oocita e dell'interfaccia cellule nutrici-oocita. Inoltre nell'ooplasma vi è la presenza di gocce di natura proteica e lipidica. Come a livello dell'interfaccia cellule follicolari-oocita,

l'oolemma presenta un sistema di microvilli ampiamente interdigitato, con spazi più ampi di quelli individuati a livello dell'interfaccia cellule follicolari-cellule nutrici (Fig. 4.19I; 4.20E,F).

- Cellule nutrici: caratterizzate da un citoplasma elettrondenso con goccioline di origine lipidica, mentre mancano quelle di origine proteica. I nuclei hanno involucro irregolare, eterocromatina organizzata in zolle e nucleoli con margini anch'essi irregolari (Fig. 4.20A).

Follicolo primario. Ha area $399 \pm 27 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (Fig. 4.19A) e lo stesso aspetto del controllo al tempo T2 .

Germario (Area totale)			
$2.3 \pm 0.4 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
$3.9 \pm 4.1 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$39.5 \pm 3.1 \times 10^3$	Cellule nutrici	$30.3 \pm 3.7 \times 10^3$	76.7
	Oocita	$4.7 \pm 0.9 \times 10^3$	11.8
	Cellule follicolari	---	11.5
Follicolo primario (Area totale)			
$399 \pm 27 \times 10^3$			

Tabella 4.13. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 175) in ovari di femmine di controllo, 90 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

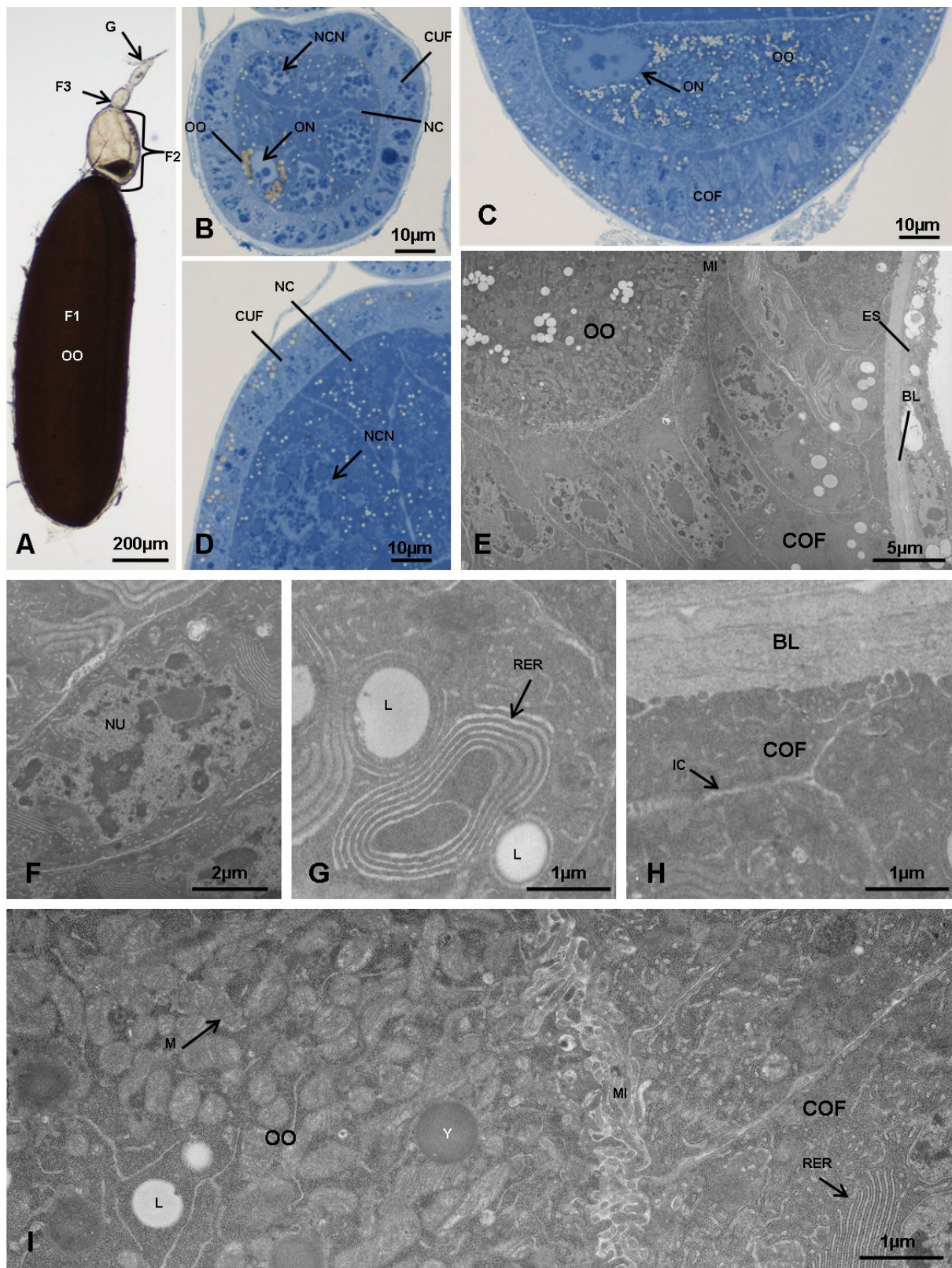


Fig. 4.19. [A-D] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* di una femmina di controllo al tempo T3. [B] Follicolo terziario in un ovariolo di una femmina di controllo al tempo T3. [C] Dettaglio della regione posteriore del follicolo secondario. [D] Dettaglio della regione anteriore laterale del follicolo secondario. [E-I] Immagini al TEM del follicolo secondario di ovarioli di controllo al tempo T3. [E] Combinazione di due immagini della regione posteriore del follicolo secondario. [F] Nucleo di una cellula follicolare colonnare. [G] Citoplasma di una cellula follicolare colonnare che mostra cisterne concentriche del reticolo endoplasmatico rugoso e alcune goccioline lipidiche. [H] Interfaccia tra la lamina basale e le cellule follicolari colonnari. [I] Interfaccia tra le cellule follicolari colonnari e l'oocita. NU: nucleo; RER: reticolo endoplasmatico rugoso; IC: spazi intercellulari; L: goccioline lipidiche; M: mitocondri; MI: microvilli; Y: sfere di tuorlo. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11 e 4.12.

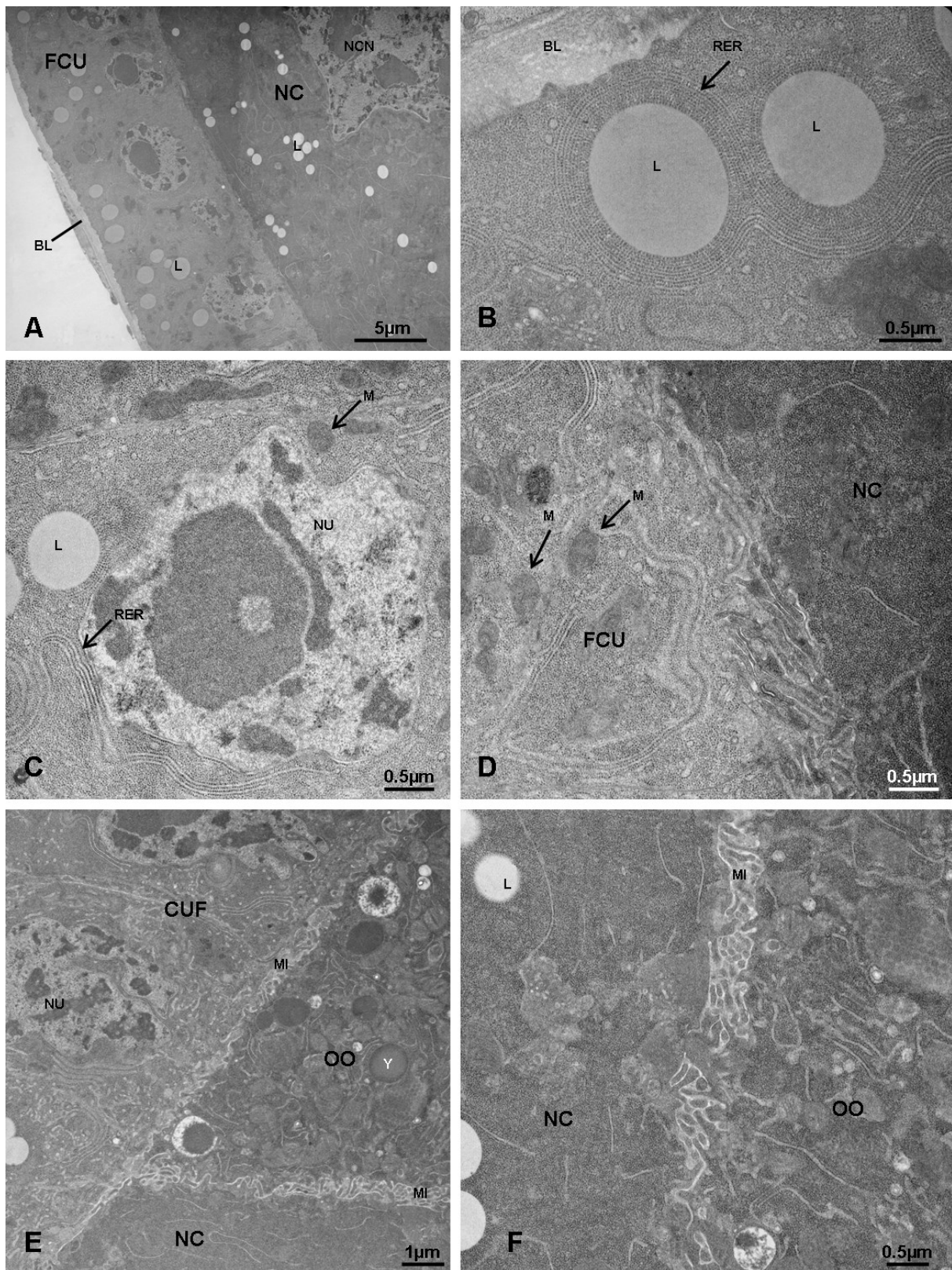


Fig. 4.20. [A-F] Immagini al TEM del follicolo secondario di ovario di femmine di controllo al tempo T3. [A] Combinazione di due immagini della regione anteriore del follicolo secondario. [B] Citoplasma di una cellula follicolare cuboidale che mostra cisterne concentriche del reticolo endoplasmatico rugoso e alcune goccioline lipidiche. [C] Nucleo di una cellula follicolare cuboidale. [D] Interfaccia tra le cellule follicolari cuboidali e le cellule nutrici. [E] Interfaccia tra le cellule follicolari, l'oocita e le cellule nutrici. [F] Interfaccia tra l'oocita e le cellule nutrici. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11, 4.12 e 4.19.

Trattato (tempo T3, 90 ore dallo sfarfallamento e 75 ore dal trattamento)

Di seguito sono descritti i quattro morfotipi (denominati 6, 7, 8 e 9) evidenziati negli ovari di femmine trattate a 90 ore dallo sfarfallamento.

Morfotipo 6

L'ovariolo è composto dal germario e da tre follicoli (Fig. 4.21A) (Tabella 4.14) e si caratterizza per la presenza di un follicolo secondario molto più sviluppato rispetto al controllo.

Germario. Posto all'estremità anteriore dell'ovariolo, con area $2.8 \pm 0.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, presenta una morfologia simile a quella riscontrata al tempo T0.

Follicolo terziario. Ha area $3.2 \pm 0.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e il suo grado di sviluppo è del tutto simile al follicolo terziario del morfotipo 3 al tempo T2.

Follicolo secondario. Ha area $233 \pm 93 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e un grado di sviluppo molto più avanzato rispetto al follicolo secondario del controllo al tempo T3. A differenza del controllo, in cui l'oocita occupa l'11.8% e le cellule nutrici il 76.7% dell'intera area del follicolo, in questo caso, contemporaneamente al maggiore sviluppo del follicolo, l'oocita appare molto più sviluppato e occupa il 43.3% dell'intera area follicolare, mentre le cellule nutrici ne occupano il 40% (Fig. 4.21B-E). Oltre alle maggiori dimensioni rispetto al controllo questo follicolo presenta le quattro tipologie di cellule che nel controllo erano state rilevate a livello del follicolo primario al tempo T1: le cellule follicolari squamose, le cellule follicolari colonnari, le cellule follicolari centripete e le border cell cluster (Fig. 4.21B-J) (Fig. 4.22A-G).

- Cellule follicolari squamose: queste cellule presentano una morfologia appiattita in senso dorsoventrale e costituiscono un epitelio squamoso, che delimita il follicolo a livello del comparto delle cellule nutrici (Fig. 4.22A). A livello ultrastrutturale queste cellule sono caratterizzate da un citoplasma poco elettrondenso, con mitocondri di forma variabile e matrice elettrondensa, ribosomi sparsi ed organizzati con reticolo endoplasmatico non più organizzato in cerchi concentrici, come descritto per le cellule follicolari cubiche e colonnari del follicolo secondario al tempo T3 (Fig. 4.22 B). Il nucleo è eucromatico con grumi di eterocromatina disposti nei pressi dell'involucro nucleare. L'interfaccia cellule follicolari squamose-cellule nutrici non evidenzia microvilli come nel controllo al tempo T3. All'esterno permane la tunica propria (Fig. 4.22A).

- Cellule follicolari colonnari: queste cellule ("mainbody cells") vanno a formare, ai lati ed alla base dell'oocita, un epitelio colonnare con ampi spazi intercellulari (Fig. 4.21F, H, J).. A livello ultrastrutturale mostrano un citoplasma scuro a causa di una grande quantità di reticolo endoplasmatico rugoso, conformato in cisterne tubolari (Fig. 4.21G).. Come nell'epitelio follicolare squamoso, i mitocondri presentano forma variabile e matrice elettrondensa; sono

inoltre presenti vescicole contenenti materiale fortemente elettrondenso. Il nucleo presenta una forma ellissoidale con eterocromatina variamente addensata (Fig. 4.21F,G).. L'interfaccia cellule follicolari colonnari-oocita è caratterizzata da una fitta presenza di microvilli interdigitati, derivanti da entrambi i tipi cellulari. Nell'oolemma è possibile individuare un'intensa attività pinocitotica, riconoscibile per la presenza di fossette rivestite ("coated pits") e, nella regione corticale dell'oocita, di vescicole rivestite di recente formazione. La stessa interfaccia presenta inoltre un grosso accumulo di corpi vitellini (precursori della membrana vitellina) caratterizzati da un aspetto elettrondenso (Fig. 4.21F, I).

- Cellule follicolari centripete: nel follicolo secondario di questo morfotipo è possibile notare un inizio di invasione delle cellule follicolari centripete a livello dell'interfaccia oocita-cellule nutrici (Fig. 4.22G).. Queste cellule si presentano con caratteristiche simili a quelle delle cellule follicolari squamose, come ad esempio il citoplasma di tonalità più chiara, i mitocondri di forma variabile a matrice elettrondensa (inserto della Fig. 4.22G) e il nucleo ellissoidale. Inoltre, come per le cellule epiteliali squamose, a livello dell'interfaccia cellule follicolari centripete-oocita e dell'interfaccia cellule follicolari-cellule nutrici, non vi è presenza di microvilli e si notano confini netti tra i tipi cellulari (Fig. 4.21E) (Fig. 4.22G).

- Border cell cluster: questo gruppo di cellule è stato individuato in microscopia ottica in resina in fase migratoria all'interno del comparto delle cellule nutrici (Fig. 4.21B, inserto); è caratterizzato dalla presenza di due tipologie cellulari: le cellule polari anteriori, al centro del cluster, e le cellule del bordo, che le circondano. Le cellule anteriori hanno un nucleo molto grande rispetto alle dimensioni cellulari ed a contorni irregolari. Al suo interno l'eterocromatina è addensata in zolle, con un nucleolo addossato all'involucro nucleare. Il citoplasma è estremamente ridotto e presenta piccoli mitocondri a matrice elettrondensa. Le cellule del bordo hanno dimensioni complessive e nucleari molto più elevate rispetto a quelle delle cellule anteriori, che si caratterizzano per un nucleo con eterocromatina addensata in piccole zolle e nucleolo centrale. Nel citoplasma sono evidenti numerosi ribosomi sparsi o associati al reticolo endoplasmatico e mitocondri a matrice elettrondensa (Fig. 4.22C, D). I margini delle cellule del bordo rivolti verso l'oocita e le cellule nutrici appaiono irregolari e, limitatamente ad aree ristrette, è possibile notare la presenza di microvilli (Fig. 4.22E, F). Rispetto al controllo le maggiori differenze a carico dell'oocita riguardano l'assenza di mitocondri a livello corticale, nell'interfaccia con le cellule nutrici e con le cellule follicolari, e la presenza di un'intensa attività pinocitotica che porta alla formazione ed all'accumulo di grandi vescicole elettrondense, come accennato nella descrizione delle cellule follicolari (Fig. 4.21F, I). A livello ultrastrutturale le cellule nutrici non mostrano differenze rispetto a quanto riscontrato nel controllo al tempo T3 (Fig.4.22A).

Follicolo primario. Ha area $383 \pm 36 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e presenta lo stesso aspetto riscontrato nel controllo al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento).

Germario (Area totale)			
$2.8 \pm 0.5 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
$3.2 \pm 0.3 \times 10^3$			
Follicolo secondario			
Area totale	Area delle singole componenti		%^(a)
$233 \pm 93 \times 10^3$	Cellule nutrici	$94.2 \pm 37.7 \times 10^3$	40,4
	Oocita	$101 \pm 58 \times 10^3$	43.3
	Cellule follicolari	---	16.3
Follicolo primario (Area totale)			
$383 \pm 36 \times 10^3$			

Tabella 4.14. Morfotipo 6. Aree medie \pm DS in μm^2 in ovarioli (n = 60) di ovari di femmine trattate, 90 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

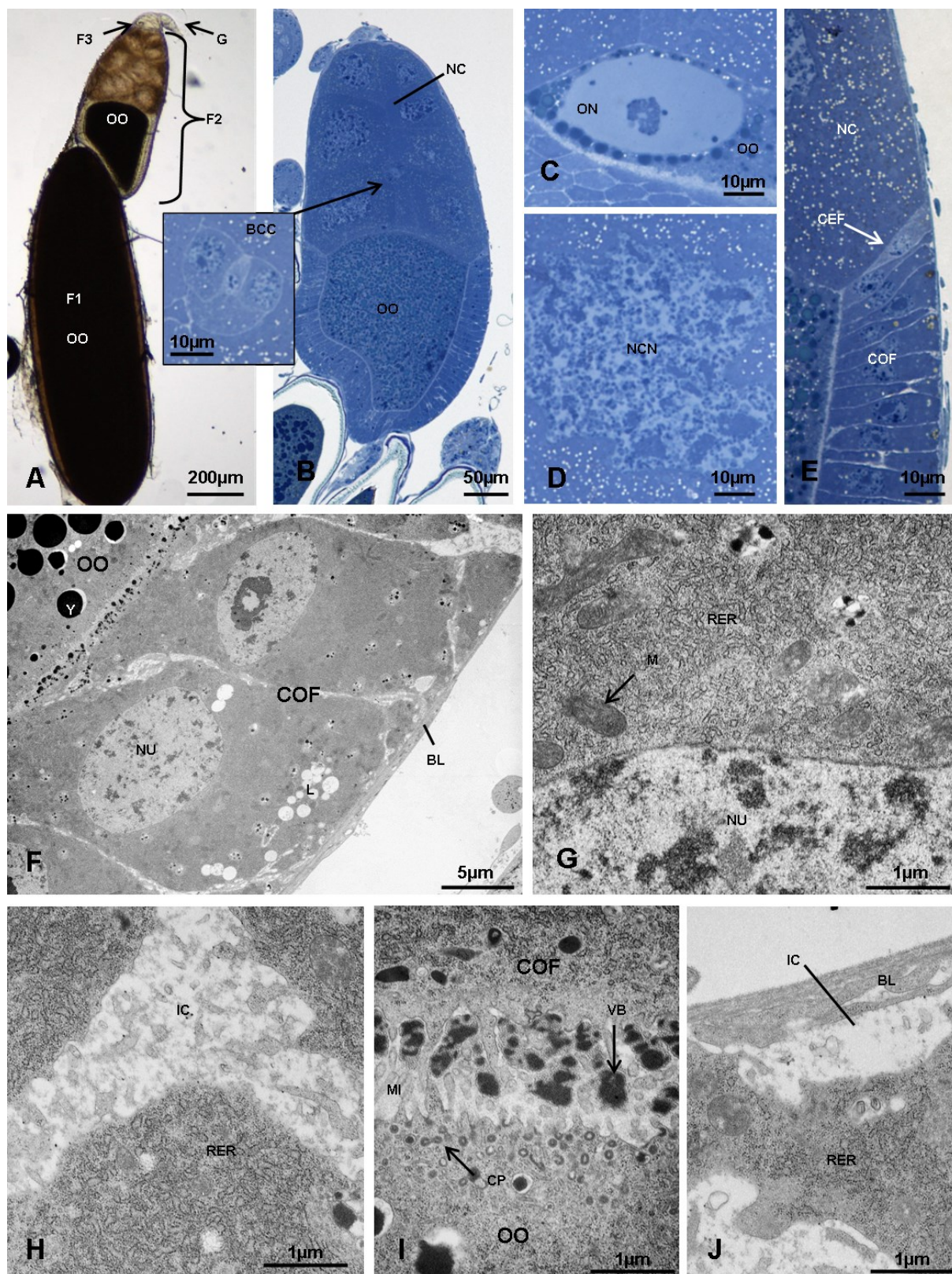


Fig. 4.21. [A-E] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* al tempo T3, morfotipo 6. [B] Follicolo secondario di un ovariolo al tempo T3, morfotipo 6; l'inserto mostra le cellule del border cell cluster in migrazione. [C] Dettaglio del nucleo del follicolo secondario. [D] Dettaglio del nucleo di una cellula nutrice nel follicolo secondario. [E] Interfaccia tra le cellule follicolari, le cellule nutrici e l'oocita. [F-J] Immagini al TEM del follicolo secondario di ovariole al tempo T3, morfotipo 6. [F] Cellule follicolari colonnari. [G] Citoplasma di una cellula follicolare colonnare che mostra il reticolo endoplasmatico rugoso e alcuni mitocondri. [H] Dettaglio degli spazi intercellulari tra le cellule follicolari colonnari. [I] Interfaccia tra le cellule follicolari colonnari e l'oocita. [J] Dettaglio della regione laterale delle cellule follicolari colonnari con ampi spazi intercellulari. VB: corpi vitellini; CP: vescicole rivestite ("coated pits"). Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11, 4.12 e 4.19.

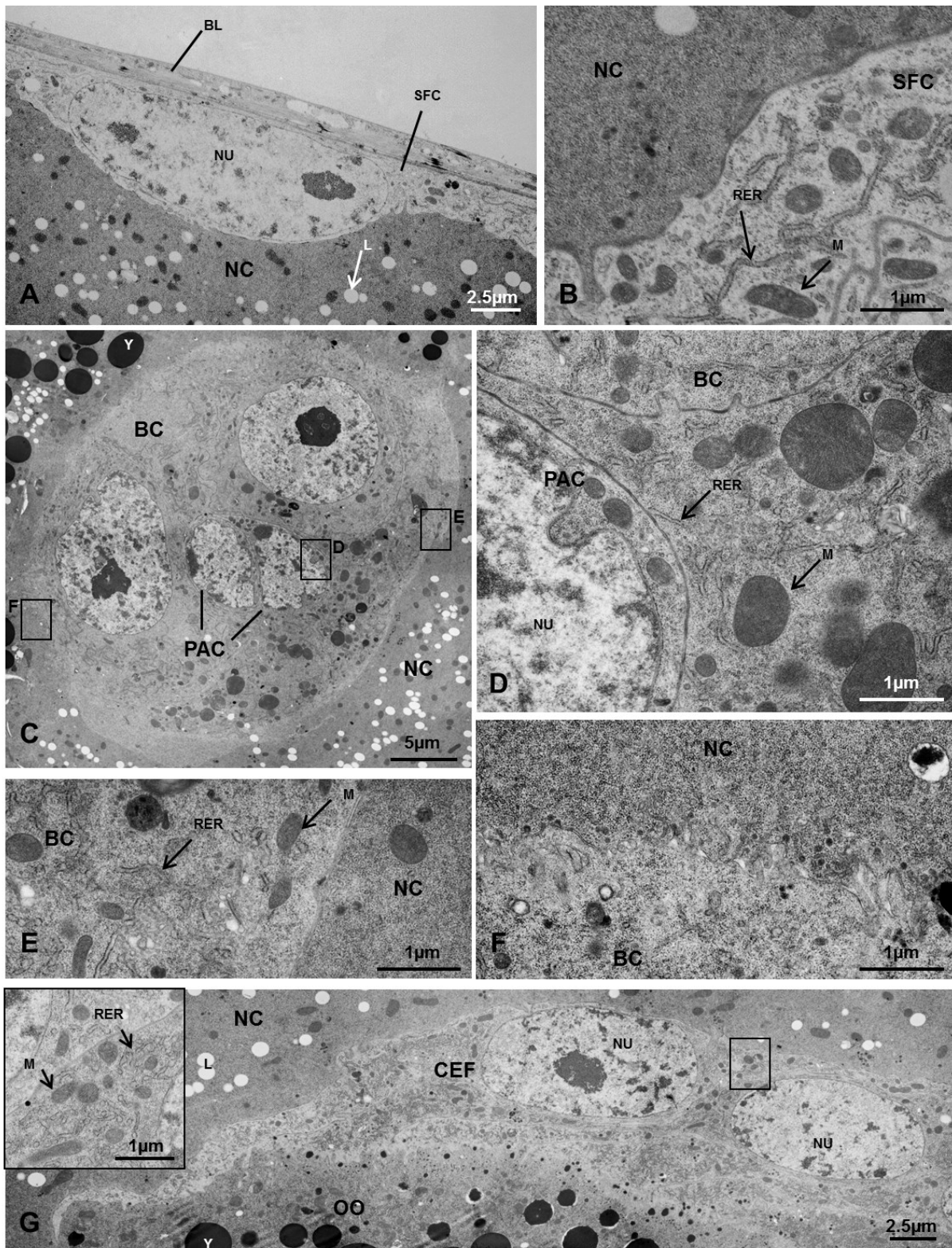


Fig. 4.22. [A-G] Immagini al TEM del follicolo secondario di ovarioli al tempo T3, morfotipo 6. [A] Cellule follicolari squamose. [B] Dettaglio dell'interfaccia tra cellule follicolari squamose e cellule nutrici. [C] Combinazione di quattro immagini delle cellule del border cell cluster. [D] Dettaglio del citoplasma delle cellule del border cell cluster e delle cellule polari. [E] [F] Interfaccia tra le cellule del border cell cluster e le cellule nutrici. [G] Combinazione di quattro immagini delle cellule follicolari centripete; l'inserto mostra il citoplasma delle cellule follicolari centripete. PAC: cellule polari anteriori; BC: cellule del border cell cluster. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11, 4.12 e 4.19.

Morfotipo 7

Ogni ovariole è composto dal germario e da tre follicoli (Fig.4.23A) (Tabella 4.15). Come nel morfotipo 4 al tempo T2 (70 ore dallo sfarfallamento), l'elemento distintivo di questo morfotipo è il follicolo secondario che mostra un quadro del tutto anomalo rispetto al controllo al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento).

Germario. Posto all'estremità anteriore dell'ovariole, ha area $2.6 \pm 0.2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la sua morfologia è del tutto simile a quella riscontrata al tempo T0.

Follicolo terziario. Ha area $14.1 \pm 1.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e uno sviluppo maggiore rispetto al follicolo terziario del controllo al tempo T3, evidenziabile per le maggiori dimensioni ed un differente aspetto delle cellule nutrici (Fig. 4.23B). Le cellule follicolari sono disposte in singolo strato, con aspetto cuboidale. All'interno della camera follicolare si possono distinguere due tipologie cellulari, le cellule nutrici e l'oocita. Le cellule nutrici, localizzate nella parte anteriore della camera follicolare, occupano complessivamente il 94.3% dell'area totale del follicolo e sono dotate di grandi nuclei eucromatici, di forma sferica a contorno irregolare, eterocromatina addensata in piccole zolle.

L'oocita è caratterizzato da un citoplasma ricco di goccioline lipidiche che indicano l'entrata in vitellogenesi e un nucleo nel quale è possibile evidenziare il cariosoma. Inoltre l'oocita occupa solamente il 2.8% dell'area totale del follicolo.

Follicolo secondario. Come il follicolo secondario del morfotipo 4 al tempo T2, il follicolo secondario di questo morfotipo è formato da una massa cellulare con area $7.8 \pm 2.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ organizzata in due regioni, una corticale ed una centrale (Fig.4.23C). Tuttavia, a differenza del follicolo secondario del morfotipo 4, sono presenti ampie zone chiare, interpretabili come spazi. A livello ultrastrutturale la tunica propria che circonda l'intero follicolo mostra un andamento ondulato e nello strato corticale del follicolo sono presenti cellule, probabilmente follicolari, con le seguenti caratteristiche:

- contorni irregolari;
- nuclei di forma variabile con eterocromatina abbondante ed organizzata in una grossa massa centrale irregolare e un numero variabile di frammenti più piccoli, anch'essi irregolari;
- mitocondri di forma variabile, con matrice elettrondensa;
- citoplasma poco elettrondenso, contenente regioni con elevato grado di rarefazione, al cui interno sono identificabili goccioline di probabile natura lipidica, e regioni elettrondense, per lo più circolari.

La caratteristica principale della regione centrale è la presenza di masse scure già individuate con la microscopia ottica in resina, che al TEM appaiono fortemente elettrondense.

Il quadro precedentemente descritto induce a ritenere che il follicolo sia in una fase degenerativa (Fig. 4.23D-F).

Follicolo primario. Ha area $372 \pm 32 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (Fig. 4.23A) e come per il morfotipo 6 ed il controllo al tempo T3, l'oocita occupa completamente la camera follicolare e le cellule nutrici sono completamente degenerate.

Germario (Area totale)			
$2.6 \pm 0.2 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$14.1 \pm 1.6 \times 10^3$	Cellule nutrici	$13.3 \pm 1.1 \times 10^3$	94.3
	Oocita	$0.4 \pm 0.1 \times 10^3$	2.8
	Cellule follicolari	---	2.9
Follicolo secondario (Area totale)			
$7.8 \pm 2.8 \times 10^3$			
Follicolo primario (Area totale)			
$372 \pm 32 \times 10^3$			

Tabella 4.15. Morfotipo 7. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovario (n = 80) in ovari di femmine trattate, 90 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

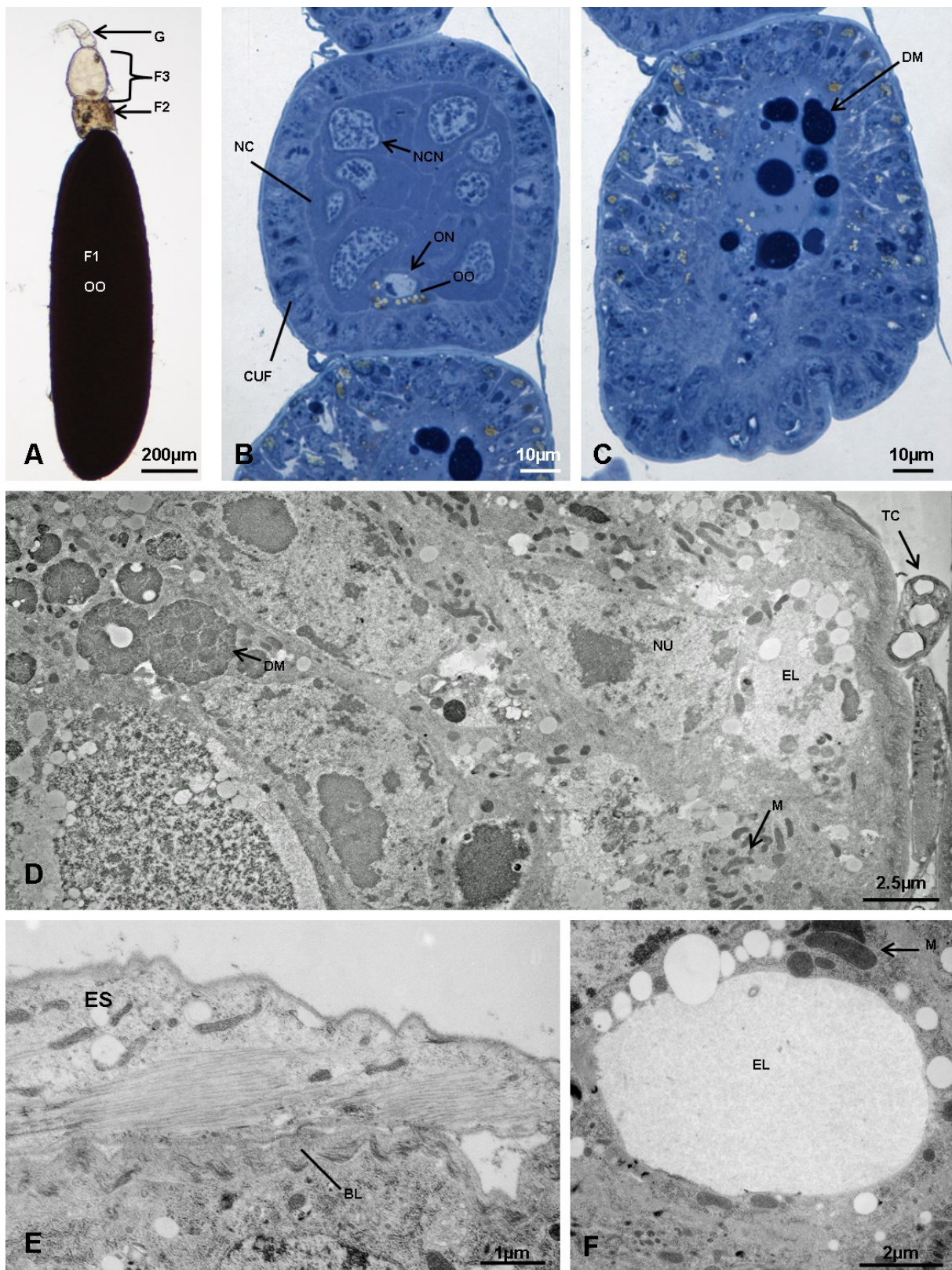


Fig. 4.23. [A-C] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* al tempo T3, morfotipo 7. [B] Follicolo secondario di un ovariolo al tempo T3, morfotipo 7. [C] Follicolo secondario in corso di degenerazione. [D-F] Immagini al TEM del follicolo secondario al tempo T3, morfotipo 7. [D] Combinazione di tre immagini della regione corticale del follicolo secondario. [E] Dettaglio dello strato esterno che mostra l'aspetto sinuoso della lamina basale. [F] Dettaglio di una area citoplasmatica chiara. EL: regioni chiare. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.19.

Morfotipo 8

Tutti gli ovariole di morfotipo 8 sono composti dal germario e da tre follicoli (Fig. 4.24A) (Tabella 4.16) e, come tutti i morfotipi descritti fino ad ora ad eccezione dei morfotipi 1 e 5, si contraddistinguono per la presenza di un follicolo secondario che appare notevolmente modificato rispetto al controllo al tempo T3 per quanto riguarda la morfologia e lo sviluppo (Fig. 4.24A, B).

Germario. Posto all'estremità anteriore dell'ovariole, ha area $2.1 \pm 0.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e la sua morfologia è del tutto simile a quella riscontrata al tempo T0.

Follicolo terziario. Ha area $10.2 \pm 1.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ed è in vitellogenesi iniziale poiché l'oocita, situato nella zona posteriore del follicolo, ha iniziato ad accumulare vitello. Le cellule nutrici, posizionate nella zona anteriore della camera follicolare, sono caratterizzate dall'occupare il 91.2 % dell'intera area follicolare; contengono nuclei rotondeggianti, di grandi dimensioni e di aspetto simile a quelli osservati nel follicolo terziario del morfotipo 7 al tempo T3 .

L'oocita occupa il 4.9% dello spazio della camera follicolare: ha un citoplasma ricco di goccioline lipidiche e il cariosoma di colore scuro per l'iniziale accumulo di vitello. L'intera camera follicolare è circondata da cellule follicolari (Fig.4.24C).

Follicolo secondario. Ha area $29.2 \pm 17.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e in microscopia ottica a fresco si presenta come una massa in cui non è possibile distinguere alcuna regione tipica del follicolo. In microscopia ottica in resina e al TEM si individuano le classiche tipologie cellulari riscontrate nel trattato al tempo T3 (cellule follicolari, cellule nutrici e oocita) ma contraddistinte da un grado di alterazione molto elevato ed un quadro morfologico di seguito descritto (Fig. 4.24B).

- Le cellule follicolari sembrano essersi differenziate in due sole tipologie, cellule follicolari squamose, delimitanti le cellule nutrici, e cellule follicolari colonnari, in posizione latero-posteriore (Fig. 4.24B-I). Non si osservano cellule centripete e cellule del border cell cluster. Il citoplasma delle cellule follicolari squamose è privo del reticolo endoplasmatico rugoso organizzato in cerchi concentrici (Fig. 4.24F), come osservato nel controllo al tempo T3, mentre sono presenti vaste aree circolari elettrondense e vistose interdigitazioni delle cellule nutrici (Fig. 4.24D, E). Anche le cellule follicolari colonnari appaiono fortemente alterate e prive del reticolo endoplasmatico rugoso organizzato in cerchi concentrici; presentano invece aree scarsamente elettrondense nelle quali il citoplasma appare rarefatto (Fig. 4.24G-I). Infine vi è la totale assenza del sistema di microvilli interdigitati a livello dell'interfaccia cellule follicolari-oocita (come nel controllo al tempo T3), ma è presente un vasto spazio intercellulare dove si evidenziano microvilli localizzati in regioni molto limitate; sull'oolemma non è presente alcun microvillo (Fig. 4.24H-I).

- Le cellule nutrici, che presentano nuclei fortemente eterocromatici di forma variabile, oltre ad avere invaso lo strato delle cellule follicolari squamose, hanno colonizzato gran parte della regione normalmente occupata dall'oocita e parte dello strato delle cellule follicolari colonnari, segregando l'oocita all'estremità posteriore del follicolo (Fig. 4.24B, inserti). Questo quadro morfologico induce a ritenere che il follicolo sia in una fase degenerativa.

Follicolo primario. Ha area $389 \pm 35 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (Fig. 4.24A) e presenta un quadro morfologico del tutto simile a quello del follicolo primario del morfotipo 6 e del controllo al tempo T3, nei quali l'oocita occupa completamente la camera follicolare e le cellule nutrici sono completamente degenerate

Germario (Area totale)			
$2.1 \pm 0.3 \times 10^3$			
Follicolo terziario (Area totale)			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$10.2 \pm 1.3 \times 10^3$	Cellule nutrici	$9.3 \pm 1.4 \times 10^3$	91.2
	Oocita	$0.5 \pm 1 \times 10^2$	4.9
	Cellule follicolari	---	3.9
Secondary cells (Area totale)			
$29.2 \pm 17.5 \times 10^3$			
Follicolo primario (Area totale)			
$389 \pm 35 \times 10^3$			

Tabella 4.16. Morfotipo 8. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovarioli ($n = 22$) in ovari di femmine trattate, 90 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

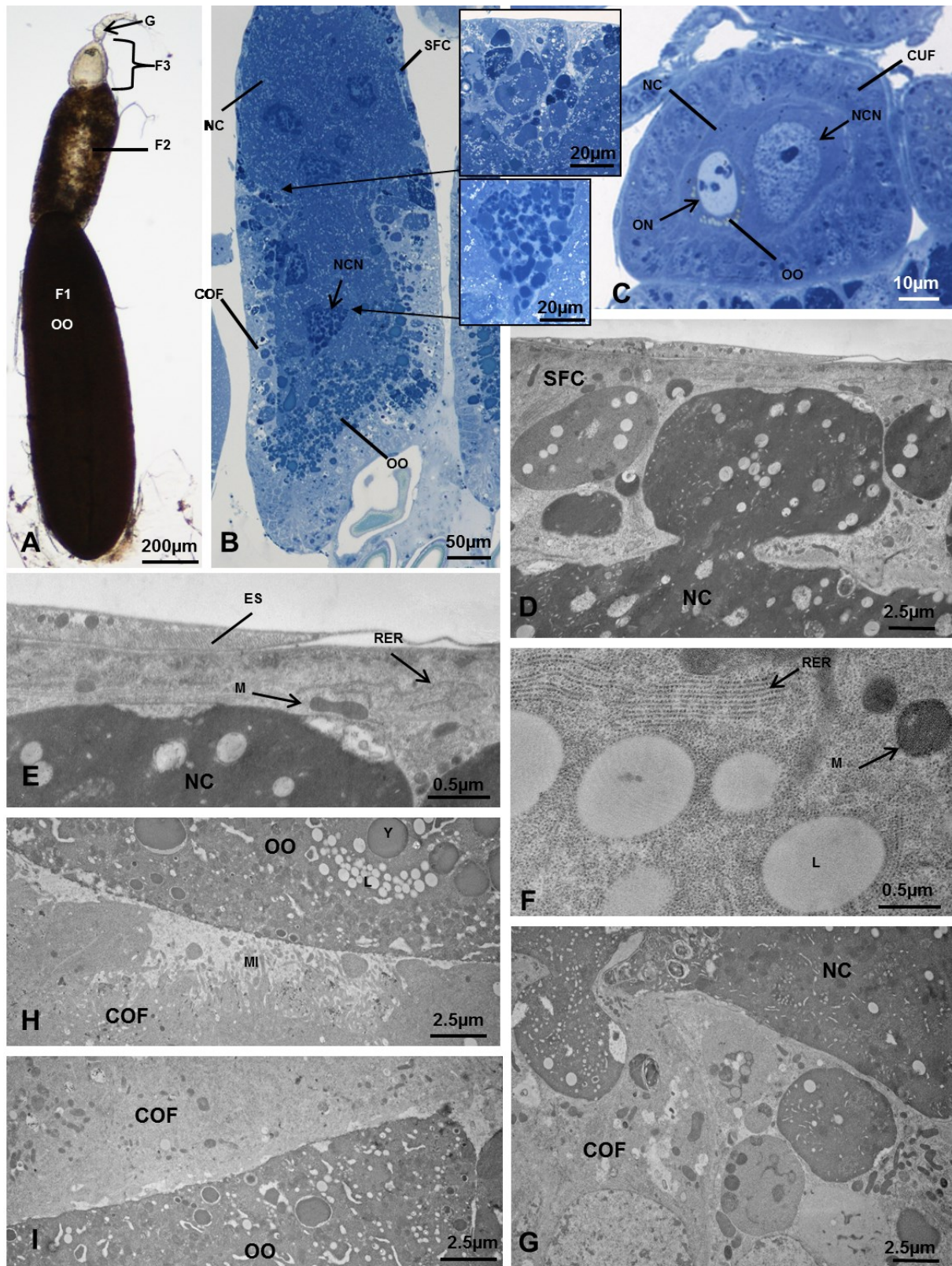


Fig. 4.24. [A-C] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* al tempo T3, morfotipo 8. [B] Follicolo secondario di un ovariole al tempo T3, morfotipo 8; gli inserti mostrano un ingrandimento dell'interfaccia tra cellule nutrici e cellule follicolari (in alto) e un nucleo di una cellula nutrice (in basso). [C] Follicolo terziario. [D-I] Immagini al TEM del follicolo secondario di ovariole al tempo T3, morfotipo 8. [D] Strato di cellule follicolari squamose invaso dalle cellule nutrici. [E] Dettaglio dell'interfaccia tra le cellule follicolari e le cellule nutrici. [G] Dettaglio dell'interfaccia tra le cellule follicolari colonnari e l'oocita, che mostra ampi spazi intercellulari. [H] Dettaglio dell'interfaccia tra le cellule follicolari colonnari e l'oocita, che mostra l'assenza di microvilli. [I] Dettaglio del citoplasma delle cellule follicolari colonnari. Abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.19.

Morfotipo 9

Questo morfotipo è composto da un germario e da un vitellario, a sua volta composto da due follicoli, detti “anteriore” e “posteriore” perché non chiaramente identificabili nel loro ordine di sviluppo. La morfologia degli ovarioli appartenenti a questo morfotipo è del tutto simile a quella del morfotipo 6 al tempo T3. Il germario ha area $3.1 \pm 0.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, il follicolo anteriore ha area $11.3 \pm 4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e quello posteriore ha area $177 \pm 47 \times 10^3$ (Fig. 4.25A-F) (Tab. 4.17).

Germario (Area totale)			
$3.1 \pm 0.5 \times 10^3$			
Follicolo anteriore (Area totale)			
$11.3 \pm 4.3 \times 10^3$			
Follicolo posteriore			
Area totale	Area delle singole componenti		% ^(a)
$177 \pm 47 \times 10^3$	Cellule nutrici	$89 \pm 47 \times 10^3$	50.3
	Oocita	$60 \pm 17 \times 10^3$	34.0
	Cellule follicolari	---	15.7

Tabella 4.17. Morfotipo 9. Aree medie \pm DS in μm^2 di ovarioli ($n = 21$) in ovari di femmine trattate, 90 ore dopo sfarfallamento. (a) Percentuali delle aree occupate dalle componenti follicolari come in Tabella 4.5.

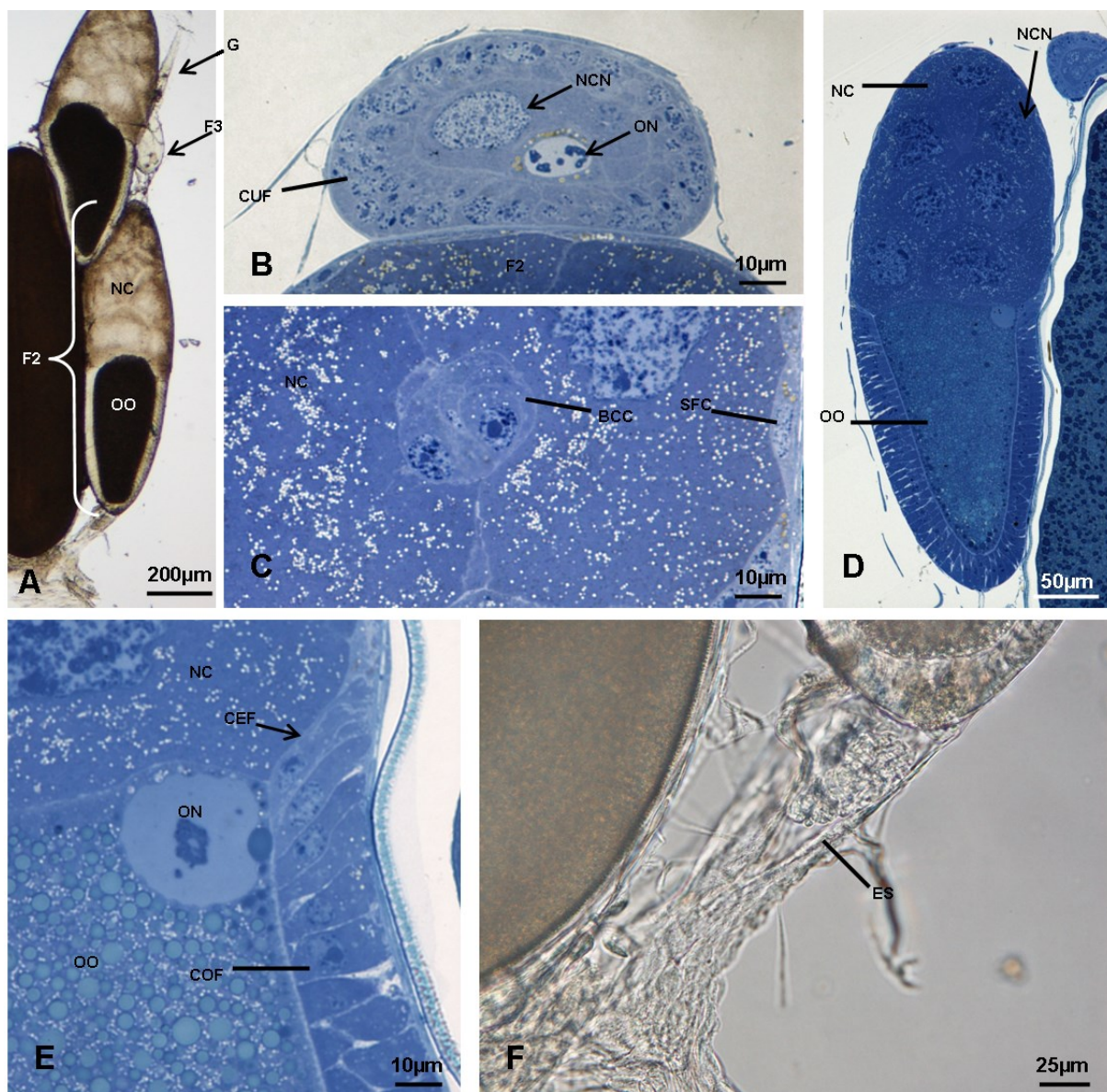


Fig. 4.25. [A-F] Immagini al microscopio ottico. [A] Ovariolo *in toto* al tempo T3, morfotipo 9. [B] Follicolo “anteriore”. [C] [D] Follicolo “posteriore” di un ovariolo al tempo T3, morfotipo 9. [C] Cellule del border cell cluster in migrazione. [D] Follicolo “posteriore” *in toto*. [E] Dettaglio dell’interfaccia tra le cellule follicolari, l’oocita e le cellule nutrici. [F] Dettaglio della guaina epiteliale nella regione posteriore del follicolo “posteriore”. Abbreviazioni come in Fig. 4.10, 4.11 e 4.12.

4.5.3 Mappatura di ovari in femmine trattate

Per effettuare la mappatura di tutti gli ovarioli e verificare la presenza di particolari disposizioni dei quattro morfotipi all'interno dello stesso ovario e/o nell'ovario controlaterale, sono stati espunti gli ovari di femmine trattate con 75 µg/µl di diofenolan al tempo T3, ovvero a 90 ore dallo sfarfallamento. Il numero di femmine utilizzate era rispettivamente di 10 femmine (5 trattate e 5 di controllo) per il calcolo delle medie degli ovarioli, e di 3 femmine (indicate con 1, 2 e 3) per la mappatura.

Gli ovari delle femmine trattate presentano, come nel controllo, una disposizione degli ovarioli in quattro cerchi concentrici costituiti, dall'esterno verso l'interno, rispettivamente da una media da 23.5 ovarioli, 18.2, 11.5 e 5.2 ovarioli: questi valori non mostrano differenze significative ($p > 0.05$) rispetto ai controlli (Tabella 4.18).

In base alla mappa rappresentata in Fig. 4.26 non è stata evidenziata alcuna particolare disposizione dei morfotipi nei singoli cerchi, né nello stesso ovario né in quello controlaterale. Il morfotipo 6 è il più abbondante nelle femmine 1 e 2, con percentuali rispettive pari al 44.9% ed al 46.5%; nella femmina 3 scende al 26.5% ed il più abbondante è il morfotipo 7, con una percentuale del 52.9%. Gli altri due morfotipi (8 e 9) sono molto meno abbondanti in tutte e tre le femmine: nel morfotipo 8 le percentuali variano da un minimo di 5.3% ad un massimo di 16.1% , mentre nel 9 variano da un minimo di 9.1% ad un massimo di 15.3% (Fig. 4.27).

Analizzando l'abbondanza dei vari morfotipi per singolo ovario, è possibile notare un certo grado di simmetria nelle femmine 1 e 2, con percentuali simili di morfotipi tra ovario destro e ovario sinistro. Nella femmina 3 si nota invece una asimmetria nei morfotipi: l'ovario sinistro presenta percentuali simili a quelle delle altre due femmine esaminate (con il morfotipo 6 al 48%, il morfotipo 7 al 33%, il morfotipo 8 al 9% e il morfotipo 9 al 10%), mentre nell'ovario destro il quadro è diverso da quello dell'ovario controlaterale: il morfotipo 7 è il più abbondante (71%), mentre il morfotipo 6, che nelle altre femmine non è mai inferiore al 41%, ha percentuale pari al 6%. Gli altri due morfotipi mostrano percentuali paragonabili a quelle degli altri ovari (8 al 14% e 9 all'8%) (Fig. 4.28).

	Numero medio di ovarioli \pm DS			
	I° cerchio	II° cerchio	III° cerchio	IV° cerchio
Controllo	24.2 ± 1.2	18.5 ± 1	11.5 ± 1	5.2 ± 0.8
Trattato	23.5 ± 0.5	18.2 ± 1.5	11.5 ± 0.8	5.2 ± 0.8

Tabella 4.18. Numero medio di ovarioli \pm DS in ciascun cerchio degli ovari di controllo e trattati al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento).

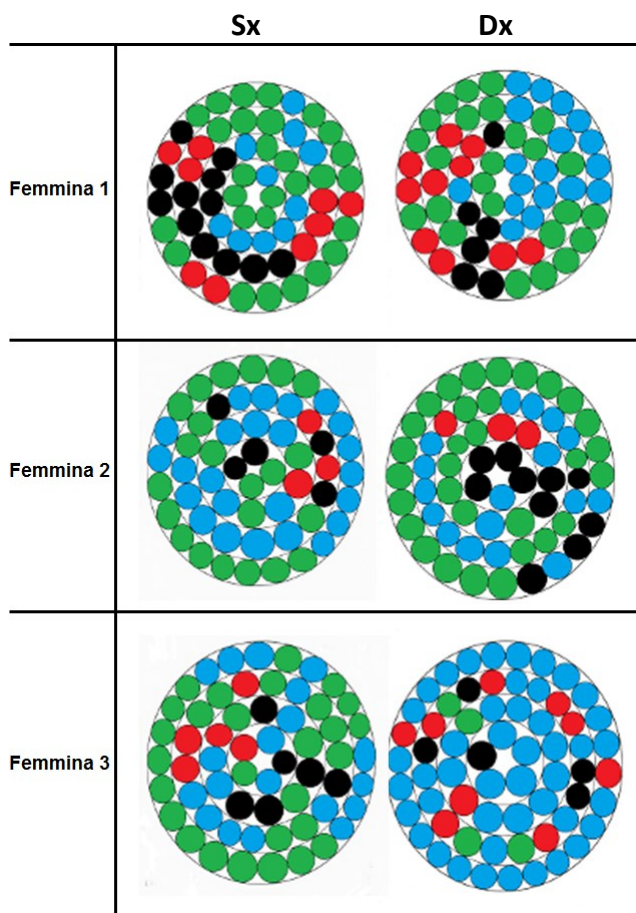


Fig. 4.26. Mappatura dei morfotipi riscontrati negli ovari di tre femmine trattate al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento).

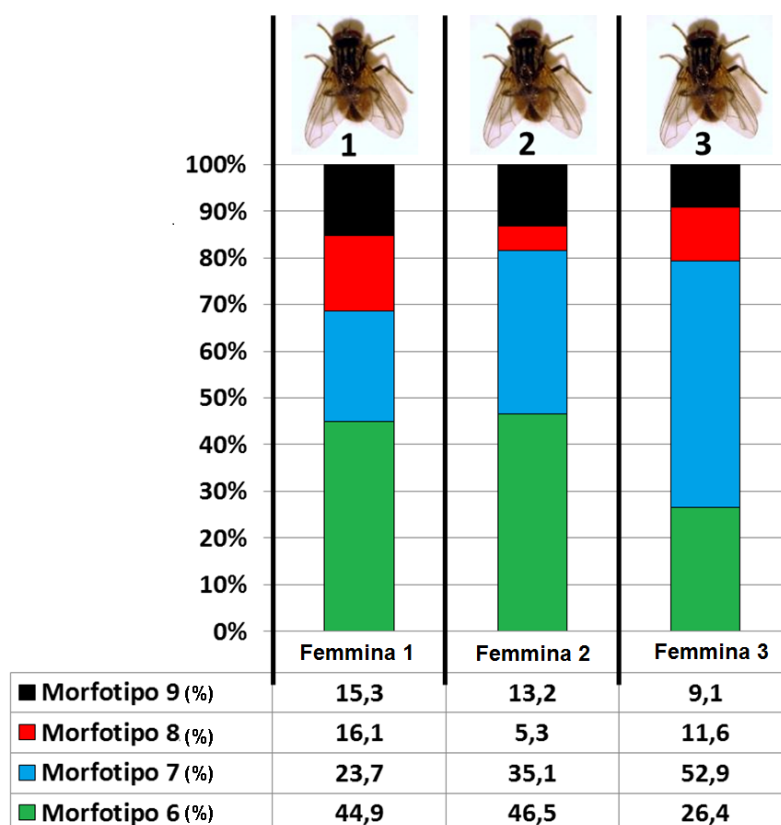


Fig. 4.27. Percentuali totali dei diversi morfotipi negli ovari di tre femmine trattate al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento).

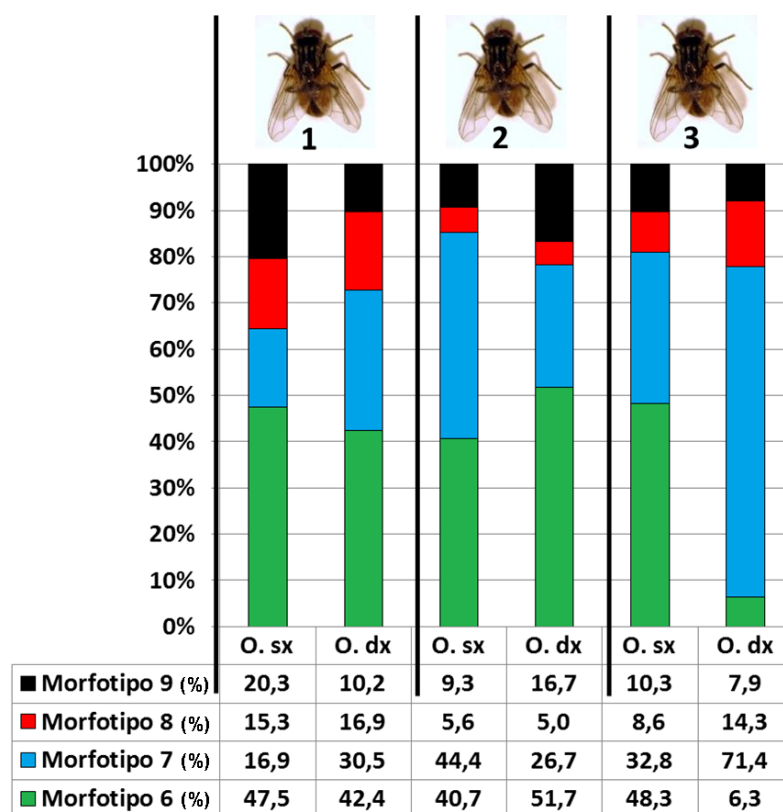


Fig. 4.28. Percentuali dei diversi morfotipi all'interno dei singoli ovari di tre femmine trattate al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento). O.sx: ovario sinistro. O.dx: ovario destro.

4.5.4 Conteggio degli ovarioli

Per quanto riguarda il numero medio di ovarioli nelle 5 femmine trattate e nelle 5 di controllo, prelevate a 15, 45, 70 e 90 ore dallo sfarfallamento (Tabella 4.19) (Fig. 4.29), non sono state osservate differenze significative ($p < 0.05$) tra i seguenti valori:

- numero medio di ovarioli nei controlli ai vari intervalli di prelievo;
- numero medio degli ovarioli nei trattati ai vari intervalli di prelievo;
- numero medio degli ovarioli dei controlli e dei trattati ai vari intervalli di prelievo.

In base a questi dati è possibile avanzare l'ipotesi che non si siano verificate degenerazioni a carico di interi ovarioli a seguito del trattamento con diofenolan.

Ore trascorse dallo sfarfallamento	Numero medio di ovarioli \pm DS	
T0P (15ore)	---	60.1 \pm 2.0
T1 (45ore)	Controllo	58.7 \pm 2.9
	Trattato	58.8 \pm 1.8
T2 (70ore)	Controllo	59.8 \pm 2.4
	Trattato	58.3 \pm 3.4
T3 (90ore)	Controllo	59.7 \pm 2.1
	Trattato	59.0 \pm 2.5

Tabella 4.19. Numero medio \pm DS di ovarioli negli ovari di femmine di controllo e trattate ai tempi T0P, T1, T2 e T3.

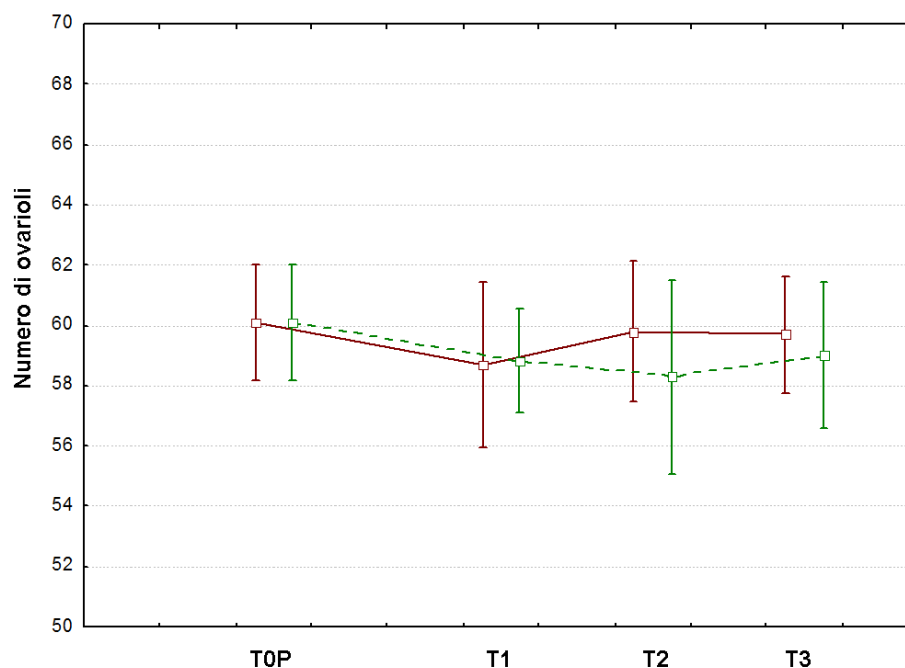


Fig. 4.29. Variazioni nel numero medio di ovarioli \pm DS in femmine di controllo e trattate nei diversi intervalli di prelievo (vedi Tab. 4.19).

4.5.5 Percorsi di trasformazione degli ovarioli

Per esaminare in modo dinamico le alterazioni morfologiche precedentemente osservate e identificare eventi degenerative o di ipertrofia, i morfotipi sono stati ordinati in una successione a partire da T0P (15 ore dallo sfarfallamento, tempo del trattamento) a T3 (90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento). Le Fig. 4.30 e 4.31 illustrano la successione dei morfotipi.

Le analisi statistiche, effettuate tramite ANOVA a una via a confronti pianificati con $p < 0.05$ sono state condotte sui dati morfometrici presentati nelle tabelle dalla 4.4. alla 4.17.

Nessuna anomalia e/o alterazione è stata riscontrata nei controlli e lo sviluppo dei follicoli da T0P a T3 mostra un aumento significativo ($p < 0.05$) dell'area follicolare (Fig. 4.30). Al contrario nelle femmine trattate sono riscontrabili evidenti alterazioni, principalmente a carico del follicolo primario e secondario. I morfotipi caratterizzati da queste alterazioni possono essere riuniti in tre "percorsi di trasformazione" ("paths") degli ovarioli a partire dal tempo T0 (Fig. 4.31).

Percorso A. Questo percorso coinvolge i morfotipi 1 (T1, 45 ore dallo sfarfallamento, 30 ore dal trattamento), 5 (T2, 70 ore dallo sfarfallamento, 55 ore dal trattamento) e 9 (T3, 90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento). In questi morfotipi sono visibili residui del follicolo primario che inizia la degenerazione tra T0P e T1; il follicolo primario diminuisce progressivamente di dimensioni fino quasi a scomparire nel morfotipo 9. L'analisi statistica sulle aree totali dei follicoli secondari nei morfotipi 1, 5 e 9 e nei controlli (Fig. 4.32) mostra differenze significative ($p < 0.05$) tra i seguenti valori:

- T0P e morfotipo 1 (T1);
- morfotipo 1 e controllo al tempo T1;
- morfotipo 1 e morfotipo 5;
- morfotipo 5 (T2) e controllo al tempo T2;
- morfotipo 5 e morfotipo 9 (T3);
- morfotipo 9 e controllo al tempo T3.

In base ai dati morfologici e alle differenze significative ($p < 0.05$) è possibile avanzare la seguente interpretazione: il morfotipo 1 si trasforma nel morfotipo 5 tra T1 e T2, e il morfotipo 5 a sua volta si trasforma nel morfotipo 9 tra T2 e T3.

Percorso B. Questo percorso riguarda il morfotipo 2/B (T1), il morfotipo 4 (T2) e il morfotipo 7 (T3). Come evidenziato dalle analisi morfologiche, in tutti questi morfotipi vi sono anomalie del follicolo secondario. Nel morfotipo 2/B il citoplasma delle cellule nutrici e dell'oocita è intensamente colorato e le cellule follicolari contengono aggregati scuri di

dimensioni variabili, possibili segni di eventi degenerativi iniziali. Nei morfotipi 4 e 7 vi sono masse cellulari irregolari (non visibili nei controlli) che indicano eventi degenerativi.

L'analisi statistica eseguita sulle aree totali dei follicoli secondari nel morfotipo 2 (senza considerare le varianti A e B, che appaiono molto simili nei preparati a fresco per microscopia ottica) e nei morfotipi 4, 7 e nei controlli (Fig. 4.33) mostra differenze significative ($p < 0.05$) tra i seguenti valori:

- T0P e morfotipo 2 (T1);
- morfotipo 2 e controllo al tempo T1;
- morfotipo 2 e morfotipo 4 (T2);
- morfotipo 4 e controllo al tempo T2;
- morfotipo 4 e morfotipo 7 (T3);
- morfotipo 7 e controllo al tempo T3.

Le analisi non mostrano differenze significative ($p > 0.05$) tra i morfotipi 4 e 7. Sulla base di questi dati è possibile concludere che il morfotipo 2/B, che presenta un follicolo secondario con segni di degenerazione, proceda nel suo sviluppo tra T1 e T2, si trasformi nel morfotipo 4 al tempo T2 e mantenga questa condizione fino al tempo T3 come morfotipo 7.

Percorso C. Questo percorso coinvolge il morfotipo 2/A (T1) e i morfotipi 3 (T2), 6 e 8 (T3). Come evidenziato dalle analisi morfologiche, il follicolo secondario è quello maggiormente coinvolto in questo percorso di trasformazione nei morfotipi 2/A (molto simile al controllo), nei morfotipi 3 e 6, che sono ad uno stadio di sviluppo più avanzato in paragone ai controlli, ed infine nel morfotipo 8, caratterizzato da una morfologia completamente alterata.

L'analisi statistica sulle aree totali di questi morfotipi (senza considerare le due varianti A e B del morfotipo 2) (Fig. 4.34, 4.35) mostrano differenze significative ($p < 0.05$) tra i valori seguenti:

- T0P e morfotipo 2 (T1);
- morfotipo 2 e controllo al tempo T1;
- morfotipo 2 e morfotipo 3 (T2);
- morfotipo 3 e controllo al tempo T2;
- morfotipo 3 e morfotipo 6 (T3);
- morfotipo 6 e controllo al tempo T3;
- morfotipo 3 e morfotipo 8 (T3);
- morfotipo 8 e controllo al tempo T3.

Sulla base delle differenze tra i morfotipi e sulle analisi statistiche, è possibile dedurre che il morfotipo 2/A non abbia anomalie tali da interferire con il suo sviluppo e che si trasformi quindi nel morfotipo 3 tra T1 e T2. Il morfotipo 3 può a sua volta trasformarsi nel morfotipo 6

poiché i follicoli secondari del morfotipo 3 mostrano dimensioni significativamente ($p < 0.05$) minori in paragone a quelle del morfotipo 6 (T3) ed entrambi i morfotipi non presentano segni di degenerazione. Si può quindi concludere che alcuni ovaroli del morfotipo 3 abbiano una elevata capacità di sviluppo tra T2 e T3, trasformandosi nel morfotipo 6. Inoltre non vi sono differenze significative ($p < 0.05$) tra l'area dell'oocita e quella delle cellule nutrici nel morfotipo 6: questo suggerisce che le grandi dimensioni raggiunte dal follicolo secondario in questo morfotipo siano dovute allo sviluppo simultaneo di entrambi i tipi cellulari (Fig. 4.36). Inoltre il morfotipo 3 può trasformarsi nel morfotipo 8 poiché il follicolo secondario del morfotipo 8 presenta dimensioni significativamente ($p < 0.05$) maggiori rispetto al morfotipo 4, quindi non può derivare da una trasformazione di questo morfotipo. Infine il follicolo secondario del morfotipo 8 ha dimensioni significativamente ($p < 0.05$) minori rispetto a quelle del morfotipo 3, e questo indica una possibile degenerazione del follicolo secondario nel morfotipo 3 tra T2 e T3.

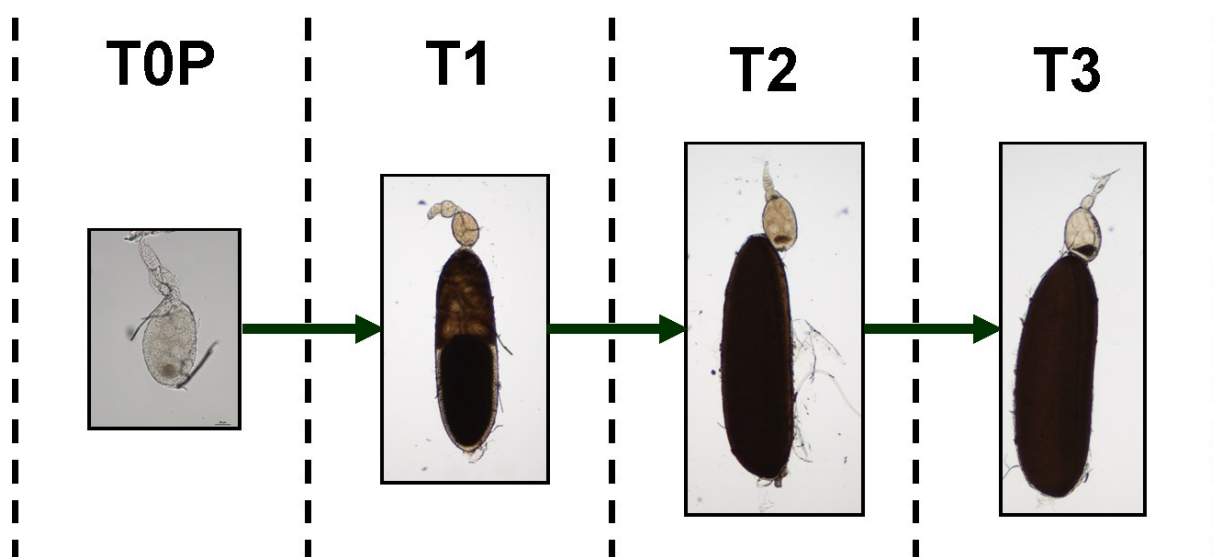


Fig. 4.30. Aspetto degli ovaroli nelle femmine di controllo ai tempi T0P (15 ore dallo sfarfallamento, tempo del trattamento), T1 (45 ore dallo sfarfallamento, 30 ore dal trattamento), T2 (70 ore dallo sfarfallamento, 55 ore dal trattamento) e T3 (90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento).

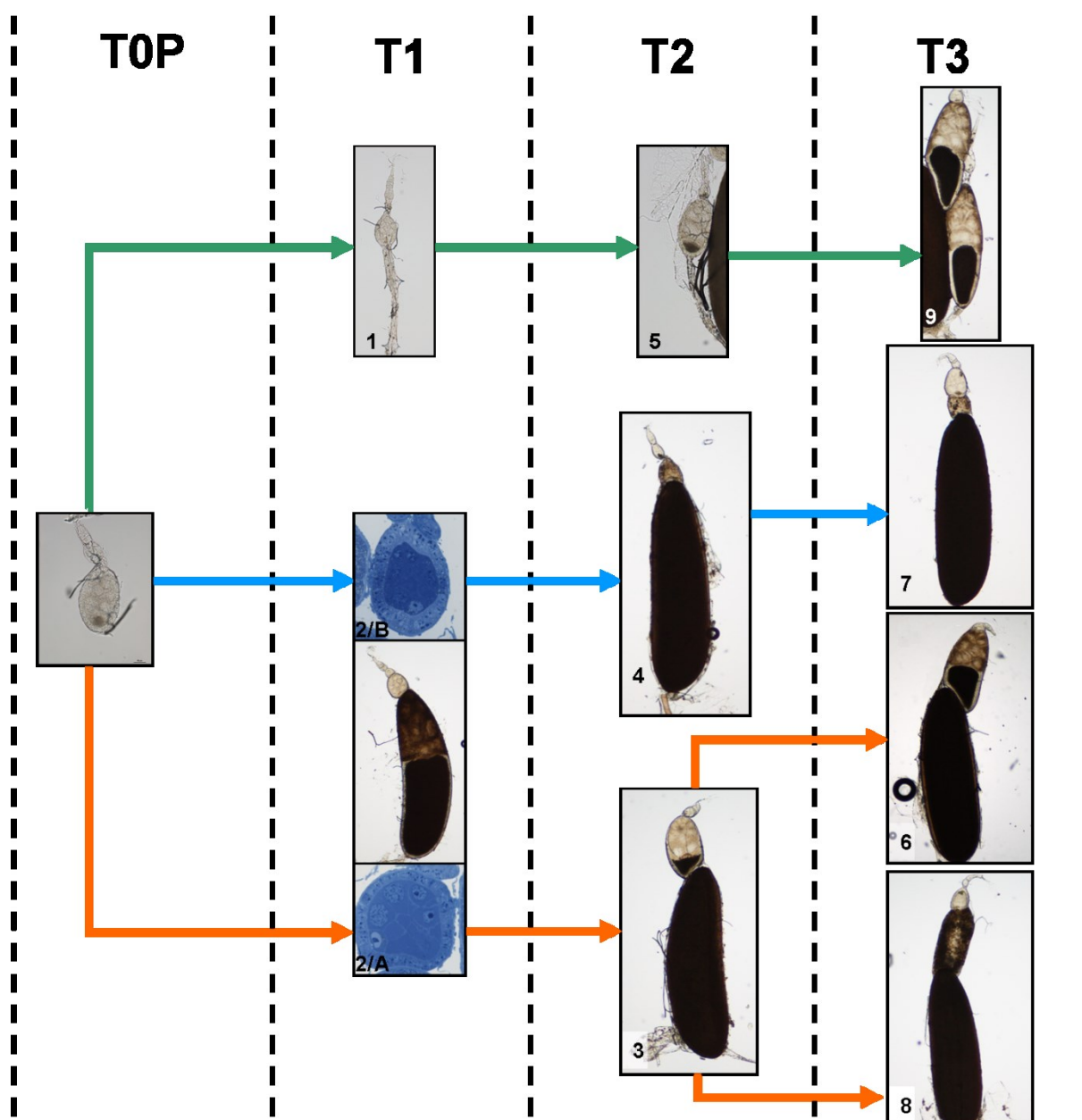


Fig. 4.31. “Percorsi di trasformazione” degli ovariole nelle femmine trattate ai tempi T0P (15 ore dallo sfarfallamento, tempo del trattamento), T1 (45 ore dallo sfarfallamento, 30 ore dal trattamento), T2 (70 ore dallo sfarfallamento, 55 ore dal trattamento) e T3 (90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento). I numeri indicano i morfotipi. Percorso A in verde, percorso B in blu, percorso C in arancione.

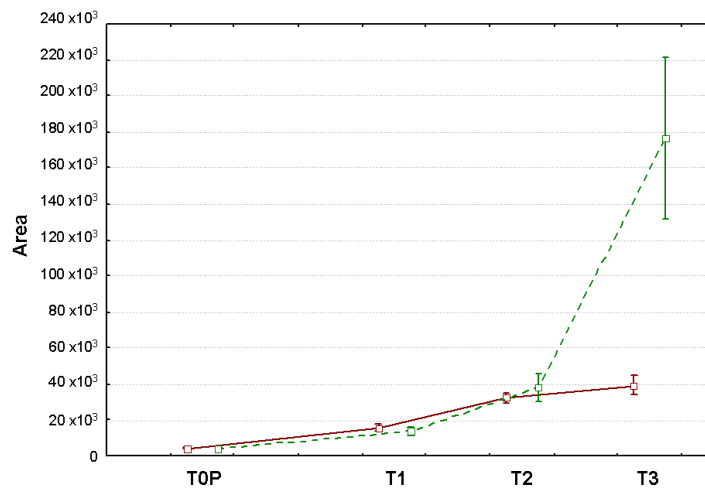


Fig. 4.32. Aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario nel morfotipo 1 al tempo T1 (45 ore dopo sfarfallamento), morfotipo 5 al tempo T2 (70 ore dallo sfarfallamento) e morfotipo 9 al tempo T3 (90 ore dopo sfarfallamento). T0P: tempo del trattamento (15 ore dopo sfarfallamento). Linea continua: aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario in

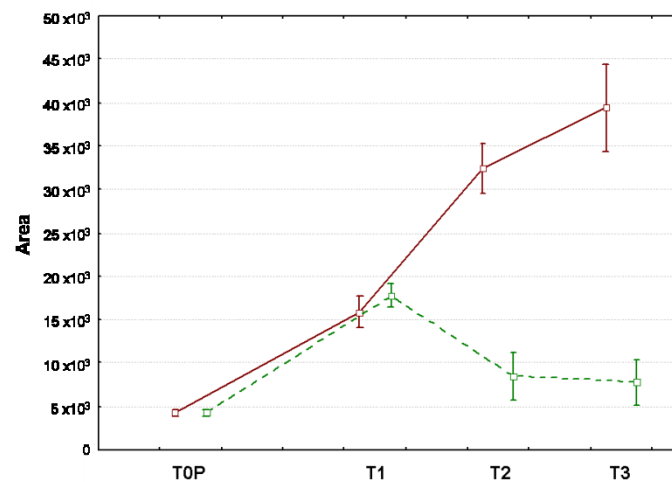


Fig. 4.33. Aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario nel morfotipo 2 al tempo T1, morfotipo 4 al tempo T2 e morfotipo 7 al tempo T3. T0P: tempo del trattamento. Linea continua: aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario in ovarioli di controllo agli stessi intervalli di tempo, come indicato in Fig. 4.32.

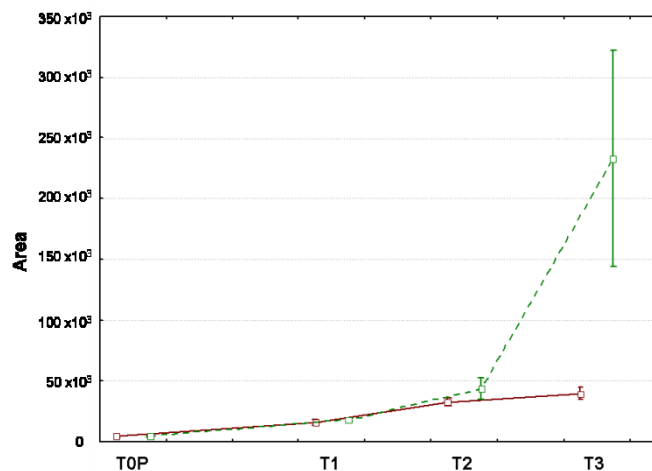


Fig. 4.34. Aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario nel morfotipo 2 al tempo T1, morfotipo 3 al tempo T2 e del morfotipo 6 al tempo T3. T0P: tempo del trattamento. Linea continua: aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario in ovarioli di controllo agli stessi intervalli di tempo, come indicato in Fig. 4.32.

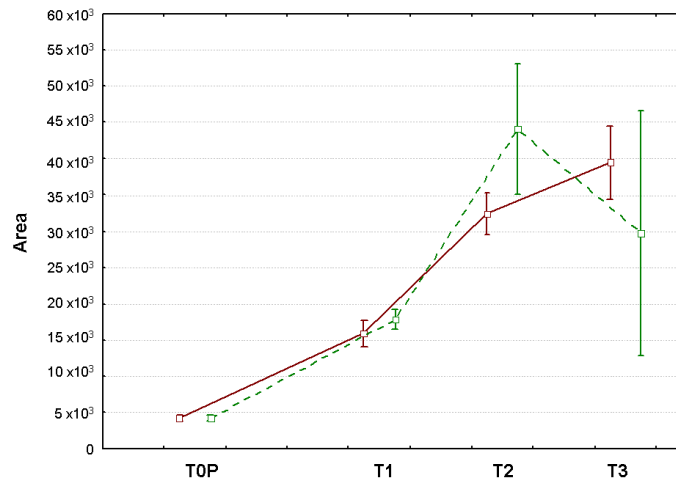


Fig. 4.35. Aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario nei morfotipi 2 al tempo T1, morfotipo 3 al tempo T2 e morfotipo 8 al tempo T3. T0P: tempo del trattamento. Linea continua: aree medie \pm DS in μm^2 del follicolo secondario in ovarioli di controllo agli stessi intervalli di tempo, come indicato in Fig. 4.32.

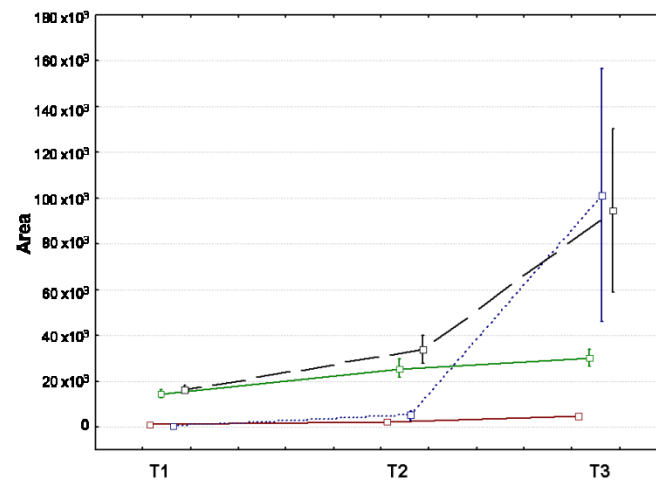


Fig. 4.36. Aree medie \pm DS in μm^2 delle componenti del follicolo secondario nel morfotipo 2 al tempo T1, morfotipo 3 al tempo T2 e morfotipo 6 al tempo T3. T0P: tempo del trattamento. Linee punteggiate e tratteggiate: aree medie \pm DS in μm^2 rispettivamente degli oociti e delle cellule nutrici in ovarioli trattati. Linee continue rosse e verdi: aree medie \pm DS in μm^2 rispettivamente degli oociti e delle cellule nutrici in ovarioli di controllo agli stessi intervalli di tempo.

4.6 Test di fecondità e schiusa per ciclo gonotrofico

Per quanto riguarda la fecondità, le indagini morfologiche hanno evidenziato alterazioni ed anomalie, in particolare nei follicoli secondari e terziari. Questi risultati generali hanno richiesto ulteriori test di fecondità per verificare nelle singole femmine a quale ciclo gonotrofico fosse legata la significativa diminuzione nella ovideposizione riscontrata durante i test di fecondità preliminari.

Confrontando tutte le femmine di controllo, ciascuna femmina ha deposto un numero simile di uova nei tre cicli gonotrofici, ad eccezione della femmina 10C, in cui il numero di uova deposte nel secondo e nel terzo ciclo diminuisce di 4-5 volte rispetto al primo ciclo (Tabella 4.20). Per quanto riguarda il numero di uova deposte dalle femmine trattate, i risultati sono i seguenti.

- Nel primo ciclo gonotrofico tutte le femmine hanno deposto uova, anche se in tre casi è stata riscontrata una riduzione numerica che ha abbassato il numero di uova deposte rispettivamente a 7, 9 e 15.

- Nel secondo ciclo gonotrofico quattro femmine su 10 non hanno deposto alcun uovo: tre erano femmine che nel primo ciclo gonotrofico avevano rispettivamente deposto 98, 100 e 106 uova; la quarta aveva deposto solamente 9 uova. Tre femmine hanno tuttavia deposto un numero di uova molto simile rispetto a quello riscontrato nel primo ciclo.

- Nel terzo ciclo gonotrofico il numero di femmine caratterizzato da assenza totale di ovideposizione sale a 7 su 10. Le femmine che hanno portato a termine il terzo ciclo gonotrofico corrispondono a quelle che avevano deposto regolarmente sia nel primo sia nel secondo ciclo. Una di queste tre femmine, tuttavia, pur avendo effettuato l'ovideposizione, ha deposto un numero di uova pari a circa la metà di quelle deposte nel primo e nel secondo ciclo (Tabella 4.20). I risultati di questi esperimenti dimostrano che tutte le femmine trattate sono in grado di portare a termine il primo ciclo gonotrofico, anche se con una certa variabilità nel numero di uova deposte: tra queste, il 60% è in grado di portare a termine il secondo ciclo gonotrofico, ma solo il 30% è in grado di portare a termine il terzo ciclo. Per quanto riguarda la fecondità, intesa come numero medio di uova deposte dalle femmine di controllo e trattate nei tre cicli gonotrofici, sono emerse le seguenti differenze significative ($p < 0.05$):

- tra controllo e trattato, riguardo al secondo ed al terzo ciclo gonotrofico;
- tra il primo e il secondo ciclo gonotrofico, per i trattati;
- tra il primo e il terzo ciclo gonotrofico, sempre per i trattati.

Si può quindi notare come nel gruppo del controllo la fecondità nei tre cicli gonotrofici non vari significativamente ($p > 0.05$), mentre nei trattati si evidenzia un calo significativo ($p < 0.05$) dopo il primo ciclo, e una inibizione progressiva della fecondità fino al terzo ciclo (Fig.

4.37). L'inibizione della fecondità, calcolata secondo Ghoneim e collaboratori (2007a) nelle femmine trattate è pari al 22% nel primo ciclo e sale al 67% nel secondo ciclo e al 75% nel terzo ciclo. L'analisi allo stereomicroscopio di ovari di femmine trattate che non avevano più deposto dopo il primo ciclo ha rivelato una mancanza di sincronia nello sviluppo dei follicoli primari e secondari, in particolare con una sovrapposizione disordinata di follicoli ad avanzato grado di maturazione (Fig. 4.38A, B). Per quanto riguarda la schiusa, nelle femmine di controllo la percentuale di uova schiuse rispetto a quelle deposte per ciclo gonotrofico è pari a 96% per il primo ciclo, 98% per il secondo ciclo e 97% per il terzo ciclo (Tabella 4.21).

L'analisi sulle femmine trattate con diofenolan ha invece prodotto i seguenti risultati:

- nel primo ciclo gonotrofico, in generale le uova deposte presentano una schiusa pari al 73%, e inoltre due femmine su 10 hanno deposto un numero molto basso di uova a bassissima schiusa (rispettivamente 9 e 7 uova, con schiusa 1 e 0) (Tabella 4.20 e 4.21);
- nel secondo ciclo si osserva una drastica diminuzione della percentuale di schiusa, che scende al 49%, con la sola eccezione di una femmina che ha deposto un numero elevato di uova ad elevata schiusa (107 uova schiuse su 124 deposte);
- nel terzo ciclo la schiusa delle uova delle sole 3 femmine in grado di ovideporre si abbassa ulteriormente fino al 24% (Tabella 4.20 e 4.21);

L'indice di sterilità, che mette in relazione la fecondità e la schiusa (Ghoneim et al., 2007a), presenta valori pari al 49% nel primo ciclo, 83% nel secondo e 94% nel terzo, indicando che all'aumentare dei cicli gonotrofici le femmine trattate diventano sempre meno in grado di generare una progenie. E' interessante notare che le uova non schiuse, analizzate allo stereomicroscopio attraverso il corion trasparente, mostravano la presenza di un embrione ad elevato grado di sviluppo, nel quale era possibile individuare la metameria del corpo e la parte cefalica (Fig. 4.38C, D).

Codice Femmine Controllo	Ciclo 1°		Ciclo 2°		Ciclo 3°		Codice Femmine Trattate	Ciclo 1°		Ciclo 2°		Ciclo 3°	
	Uova deposte	Uova schiose	Uova deposte	Uova schiose	Uova deposte	Uova schiose		Uova deposte	Uova schiose	Uova deposte	Uova schiose	Uova deposte	Uova schiose
1 C	62	60	59	57	60	58	1 T	80	72	11	3	0	---
2 C	58	53	56	55	62	61	2 T	106	103	0	---	0	---
3 C	89	81	95	94	86	84	3 T	100	70	0	---	0	---
4 C	117	116	121	121	123	123	4 T	9	1	0	---	0	---
5 C	97	94	109	106	95	91	5 T	106	84	88	20	92	20
6 C	83	82	90	86	56	54	6 T	15	10	3	1	0	---
7 C	110	107	121	120	116	111	7 T	126	76	124	107	94	28
8 C	99	94	109	106	110	105	8 T	7	0	10	9	0	---
9 C	101	97	98	95	109	106	9 T	98	58	0	---	0	---
10 C	86	85	16	16	21	21	10 T	61	42	56	3	23	2

Tabella 4.20. Numero di uova deposte e schiose per singola femmina nei primi tre cicli gonotrofici.

	Ciclo gonotrofico	Fecondità \pm DS	Inibizione della fecondità (%)	Schiusa (%)	Indice di sterilità (%)
Controllo (numero femmine = 10)	1°	90.2 \pm 19.0	---	96	---
	2°	87.4 \pm 33.8	---	98	---
	3°	83.8 \pm 33.0	---	97	---
Trattate (numero femmine = 10)	1°	70.8 \pm 45.1	22	73	41
	2°	29.2 \pm 44.8	67	49	83
	3°	20.9 \pm 38.8	75	24	94

Tabella 4.21. Riepilogo della capacità riproduttiva di femmine di *M. domestica* in seguito al trattamento con diofenolan. Fecondità \pm DS = media delle uova deposte per ciclo gonotrofico da femmine di controllo e trattate; Inibizione della fecondità = (media uova deposte dai controlli per ciclo – media uova deposte dai trattati per ciclo/ media uova deposte dal controllo per ciclo) x100; Schiusa = (totale uova deposte dai trattati per ciclo x100)/ totale uova deposte dai controlli per ciclo; Indice di sterilità = 100-(fecondità trattati x schiusa trattati/ fecondità controlli x schiusa controlli) x100.

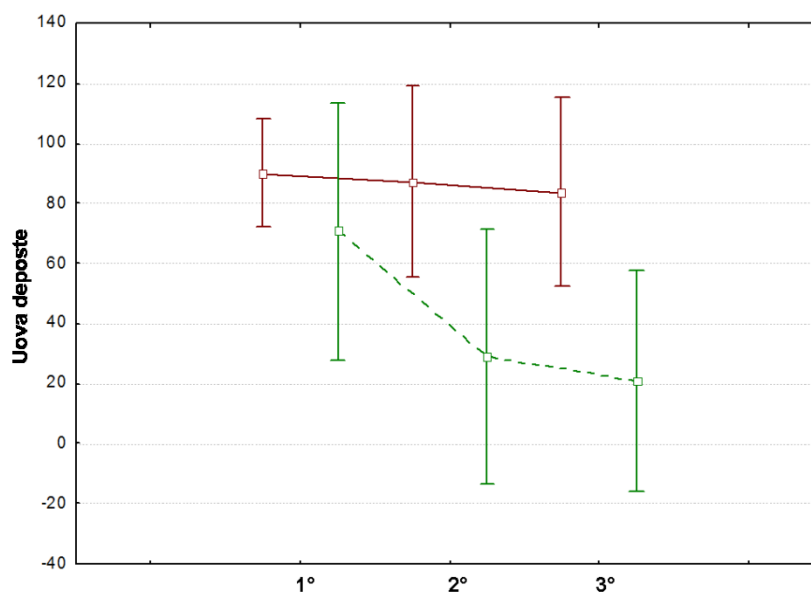


Fig. 4.37. Medie \pm DS del numero totale di uova deposte nei primi tre cicli gonotrofici dalle femmine di controllo e dalle femmine trattate.

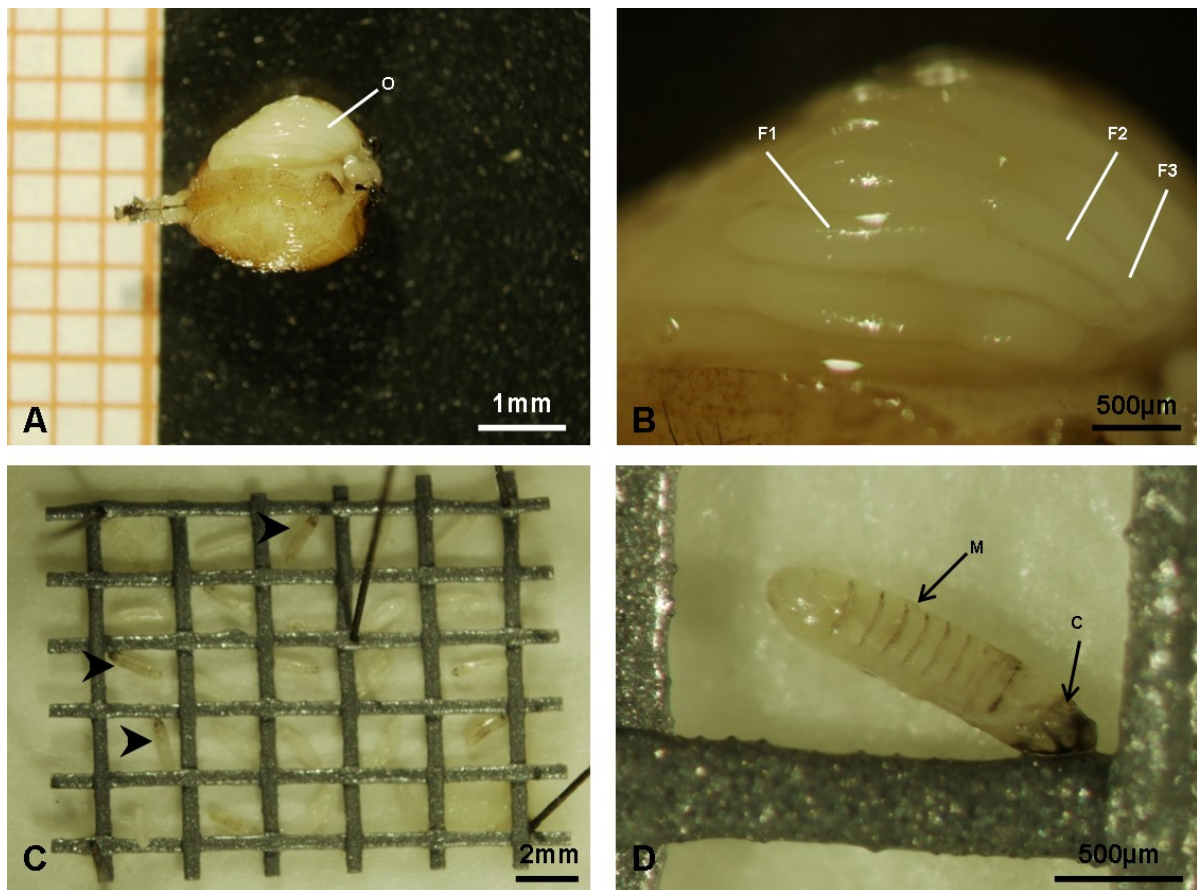


Fig. 4.38. Immagini allo stereomicroscopio. [A] Lato ventrale di un addome rigonfio di una femmina trattata e morta dopo avere deposto uova solo nel primo ciclo gonotrofico: in alto sono visibili gli ovaroli. [B] Dettaglio degli ovaroli che mostra la sovrapposizione disordinata dei follicoli ad uno stadio avanzato di sviluppo. [C] Griglia per uova che mostra alcune uova non schiuse, indicate da una freccia triangolare. [D] Dettaglio di un uovo non schiuso. O: ovario; F1, F2, F3: rispettivamente follicolo primario, follicolo secondario e follicolo terziario; M: corpo metameroico; C: estremità cefalica.

4.7 Ultrastruttura delle uova deposte nei tre primi cicli gonotrofici

La descrizione ultrastrutturale della superficie delle uova è stata effettuata mediante microscopia a scansione (SEM) e si basa su quella riportata da Hinton (1967) e Cummings e collaboratori (1974).

Per quanto riguarda le femmine di controllo non sono stati riscontrati quadri morfologici differenti tra le uova deposte nei primi tre cicli gonotrofici. Sarà quindi data solo una descrizione generale della morfologia della superficie dell'uovo valida per tutti e tre i cicli (Fig. 4.39A-L). Le uova del ceppo s-DBF di *M. domestica* hanno forma ovale, con un'area leggermente concava a livello dorsale, denominata "piastrone", delimitata da due solchi longitudinali paralleli, o "linee di schiusa", che tendono a divergere all'estremità posteriore per poi ricongiungersi all'estremità anteriore (Fig. 4.39A-C). In sezione il corion è costituito da uno strato mediano compatto da cui si dipartono altri due strati, uno interno ed uno esterno. Questi due strati hanno un aspetto colonnare e sono perpendicolari allo strato mediano (Fig. 4.39D). Nella zona esterna al piastrone le colonne presentano, agli apici, delle ramificazioni

perpendicolari che formano uno strato fittamente perforato (Fig. 4.39E). La superficie del corion è dotata di un'ornamentazione superficiale di forma esagonale ed eptagonale, che riflette il profilo delle cellule follicolari (Fig. 4.39G). Nella zona del piastrone lo strato esterno è sempre costituito da uno strato colonnare, al cui apice non si sviluppano fitte ramificazioni ma espansioni con aspetto claviforme (Fig. 4.39F). Questa morfologia fa apparire l'area del piastrone come una zona fittamente perforata, che mantiene l'ornamentazione esagonale ed eptagonale riscontrata al di fuori delle linee di schiusa.

Il confine tra il piastrone e l'area al di fuori delle linee di schiusa appare molto marcato e ben identificabile ai lati e nella zona anteriore, dove le linee convergono. Nella zona posteriore, nella quale le linee terminano divergendo tra loro, il confine non è netto e presenta zone di transizione tra lo strato colonnare con apici claviformi e quello con fitte ramificazioni (Fig. 4.39A-C). All'estremità anteriore dell'uovo è presente un micropilo imbutiforme, circondato da una regione dotata di perforazioni con varie dimensioni (Fig. 4.39B, H). All'estremità posteriore sono individuabili uno o due aperture, denominate aeropili polari, con forma variabile (circolare, quadrangolare o triangolare). All'esterno gli aeropili appaiono come aperture che interessano lo strato colonnare esterno e ciascun aeropilo è delimitato da una bordatura sopraelevata, determinata dall'intersezione delle impronte di un numero variabile di cellule follicolari. Nelle uova con una coppia di aeropili il numero delle impronte è 3-4, mentre nelle uova con un singolo aeropilo il numero di queste impronte è 4-6 (Fig. 4.39I, J).

All'interno degli aeropili è possibile individuare un sistema di creste, variamente conformato, la cui caratteristica comune è di convergere verso il centro dell'apertura, formando una struttura paragonabile ad un fascio di steli (Fig. 4.39K, L).

Per quanto riguarda le uova deposte dalle femmine trattate nei tre cicli gonotrofici (Fig. 4.40A-L) non sono stati individuati quadri morfologici anomali o alterati rispetto a quanto osservato nei controlli.

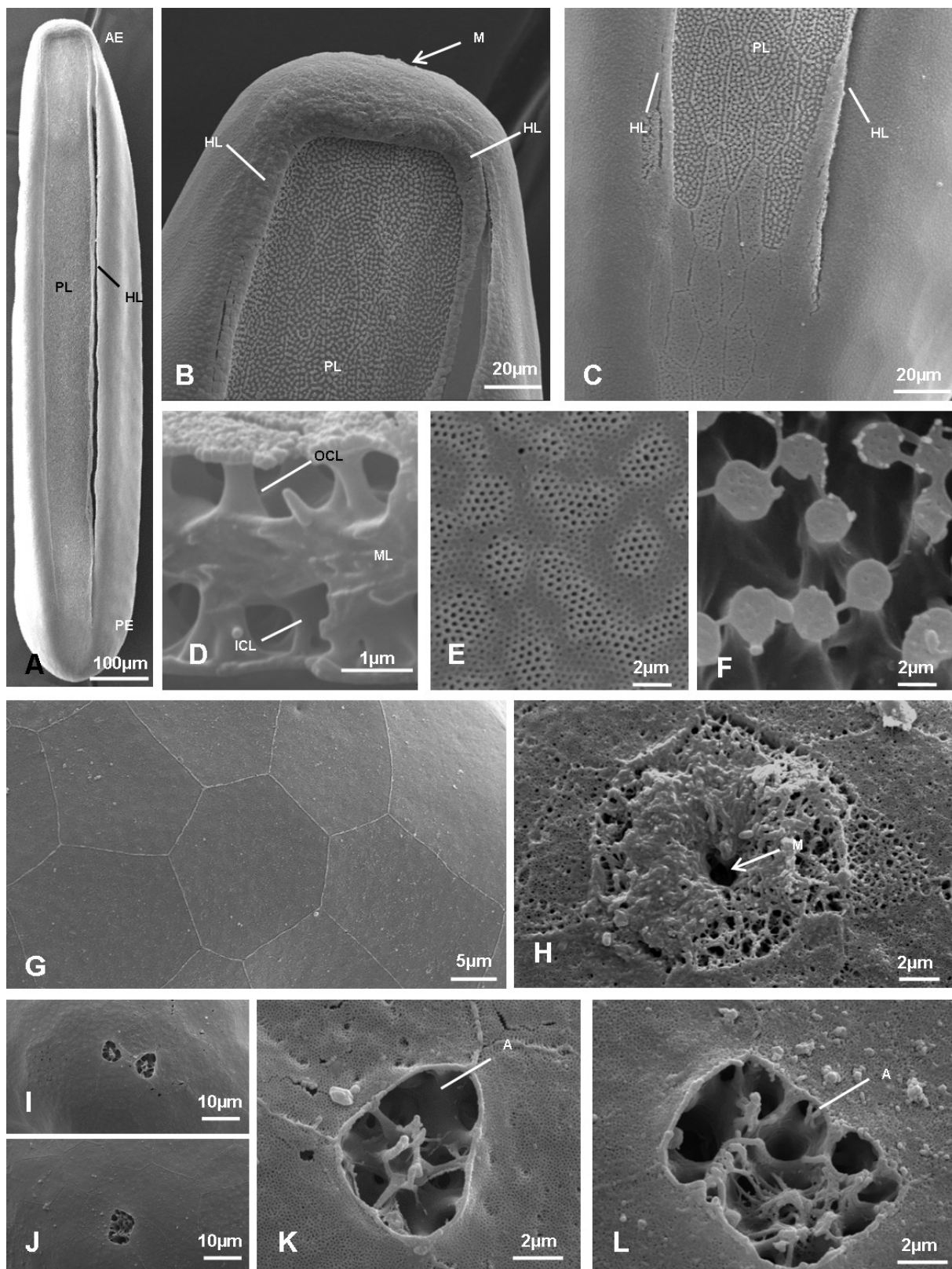


Fig. 4.39. Immagini al SEM di uova deposte da femmine di controllo. [A] Visione generale di un uovo che mostra il piastrone fiancheggiato dalle linee di schiusa. [B] Regione anteriore: il confine del piastrone è contrassegnato dalle due linee di schiusa che convergono nella regione anteriore. [C] Regione posteriore: il confine del piastrone non è chiaramente visibile a causa della divergenza delle linee di schiusa. [D] Sezione del corion. [E] Superficie esterna del corion al di fuori delle linee di schiusa. [F] Superficie del piastrone. [G] Impronte esagonali ed eptagonali delle cellule follicolari sulla superficie del corion. [H] Area micropilare con aspetto spongiforme che circonda il micropilo. [I] Uovo con due aeropili polari. [J] Uovo con un solo aeropilo polare. [K] Dettaglio di un aeropilo di un uovo con due aeropili polari. [L] Dettaglio di un aeropilo di un uovo con un solo aeropilo polare. PL: piastrone; HL: linea di schiusa; AE: estremità anteriore; PE: estremità posteriore; M: micropilo; ML: strato intermedio; OCL: strato colonnare esterno; ICL: strato colonnare interno; A: aeropilo polare.

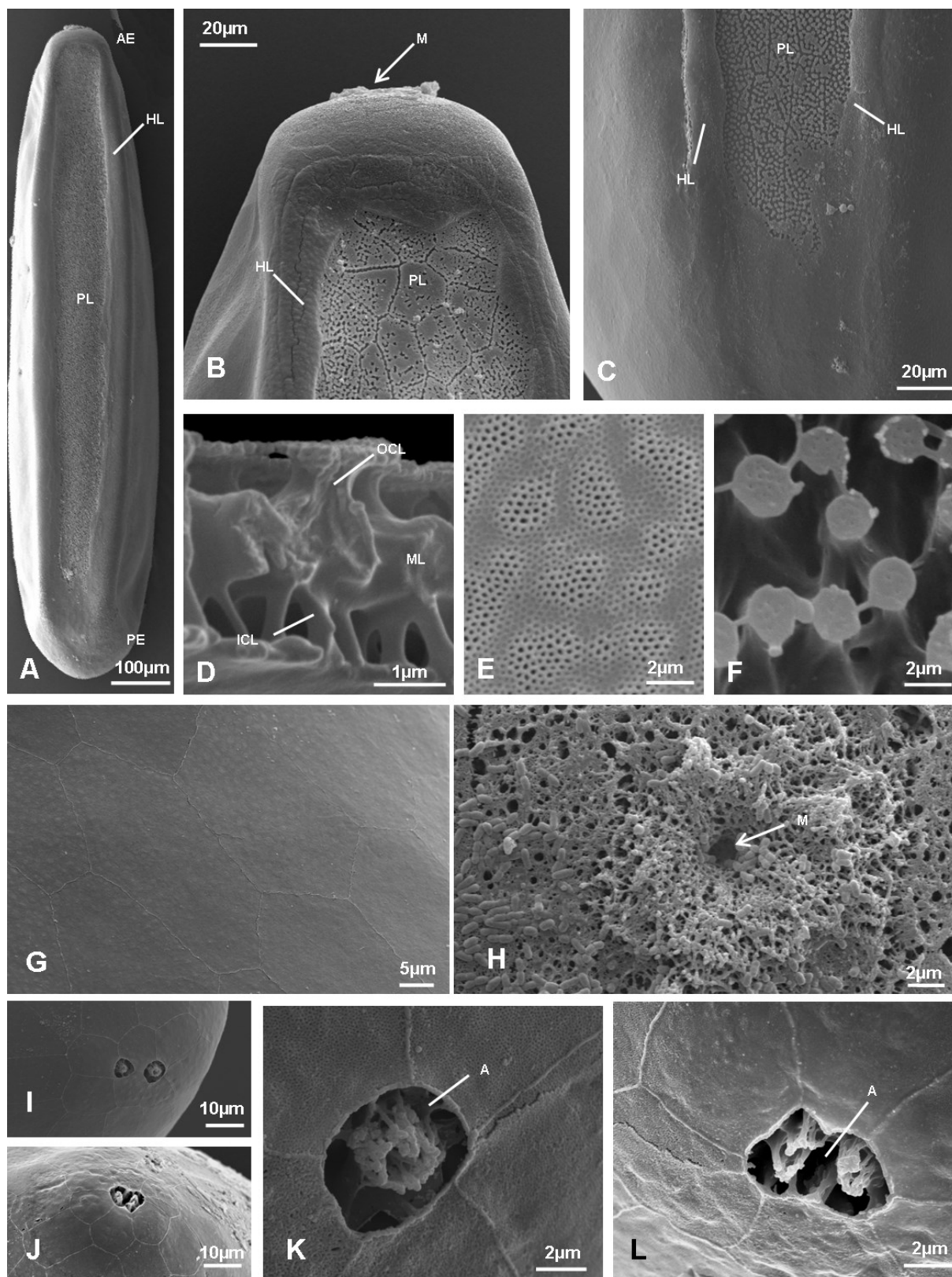


Fig. 4.40. Immagini al SEM di uova deposte da femmine trattate. [A] Visione generale di un uovo che mostra il piastrone fiancheggiato dalle linee di schiusa. [B] Regione anteriore: il confine del piastrone è contrassegnato dalle due linee di schiusa che convergono nella regione anteriore. [C] Regione posteriore: il confine del piastrone non è chiaramente visibile a causa della divergenza delle linee di schiusa. [D] Sezione del corion. [E] Superficie esterna del corion al di fuori delle linee di schiusa. [F] Superficie del piastrone. [G] Impronte esagonali ed eptagonali delle cellule follicolari sulla superficie del corion. [H] Area micropilare con aspetto spongiforme che circonda il micropilo. [I] Uovo con due aeropili polari. [J] Uovo con un solo aeropilo. [K] Dettaglio di un aeropilo di un uovo con due aeropili polari. [L] Dettaglio di un aeropilo di un uovo con un solo aeropilo polare. Abbreviazioni come in Fig. 4.39.

4.8 Contenuto di ecdisteroidi nelle femmine

Il contenuto totale di ecdisteroidi negli omogenati di singole femmine di *M. domestica* è stato valutato tramite EIA. I risultati di questo saggio immunologico sono illustrati nella Tabella 4.22. L'analisi statistica (ANOVA ad una via a confronti pianificati) effettuata sul contenuto medio di ecdisteroidi in singole femmine di controllo e trattate, a intervalli diversi di prelievo, (vedi sezione Materiali e Metodi) ha evidenziato la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) tra:

- il tempo T0 (sfarfallamento) e tutti gli altri tempi (T0P, T1, T2 e T3) nel trattato e nel controllo;
- il tempo T0P (15 ore dallo sfarfallamento, tempo di trattamento) e il trattato al tempo T1 (45 ore dallo sfarfallamento, 30 ore dal trattamento);
- il controllo e il trattato al tempo T1;
- il controllo al tempo T1 e il controllo al tempo T2 (70 ore dallo sfarfallamento, 55 ore dal trattamento);
- il trattato al tempo T1 e il trattato al tempo T2;
- il controllo e il trattato al tempo T2.

Il contenuto medio di ecdisteroidi nei vari intervalli di prelievo (Fig. 4.41) presenta un singolo picco al momento dello sfarfallamento (79.3 ± 17.4 pg/mg). In seguito, al tempo T1 il contenuto medio di ecdisteroidi si alza nei controlli e si abbassa nei trattati, mentre al tempo T2 l'andamento si inverte, per tornare su valori simili al tempo T3.

Ore trascorse dallo sfarfallamento		Contenuto medio di ecdisteroidi \pm DS (pg equivalenti/ mg mosca)
T0 (0 ore)	---	79.3 ± 17.4
T0P (15 ore) ^(a)	---	34.8 ± 9.2
T1 (45 ore)	Controllo	41.8 ± 8.3
	Trattato	21.5 ± 8.3
T2 (70 ore)	Controllo	19.0 ± 5.4
	Trattato	36.3 ± 5.6
T3 (90 ore)	Controllo	17.2 ± 4.5
	Trattato	21.4 ± 7.8

Tabella 4.22. Contenuto medio di ecdisteroidi \pm DS (pg equivalenti/ mg peso di ogni singola femmina) nei vari intervalli di prelievo. Per ciascun intervallo di tempo sono state analizzate 10 femmine di controllo e 10 femmine trattate.

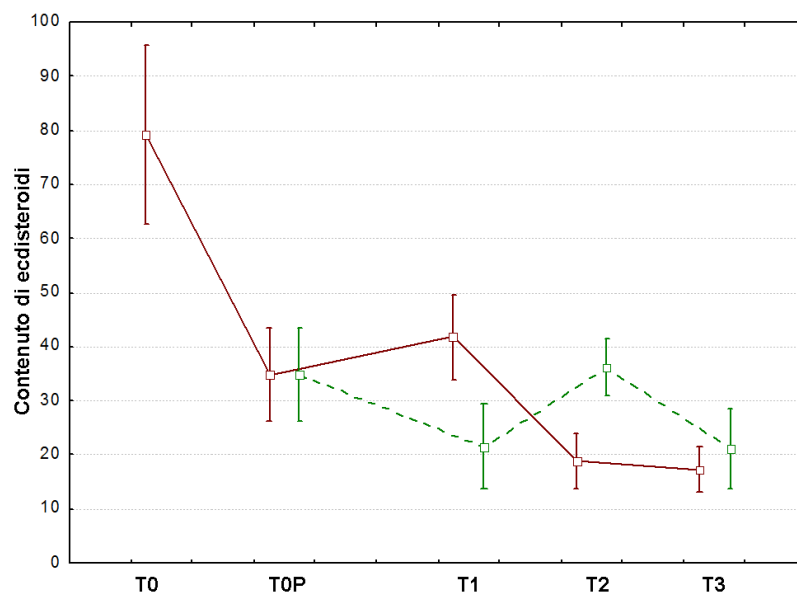


Fig. 4.41. Contenuto medio in ecdisteroidi \pm DS misurato mediante saggio immunoenzimatico (EnzymeImmunoAssay, EIA) in femmine di controllo e trattate a diversi intervalli di tempo (vedi Tabella 4.22).

4.9 Corpora allata

4.9.1 Morfologia ed ultrastruttura dei corpora allata

Nelle femmine di *M. domestica* i corpora allata sono fusi in un'unica struttura (parte dell'anello di Weismann) localizzata dorsalmente all'aorta e collegata, tramite nervi allatocardiaci, ai corpora cardiaca, localizzati ventralmente all'aorta (Fig. 4.42A, B).

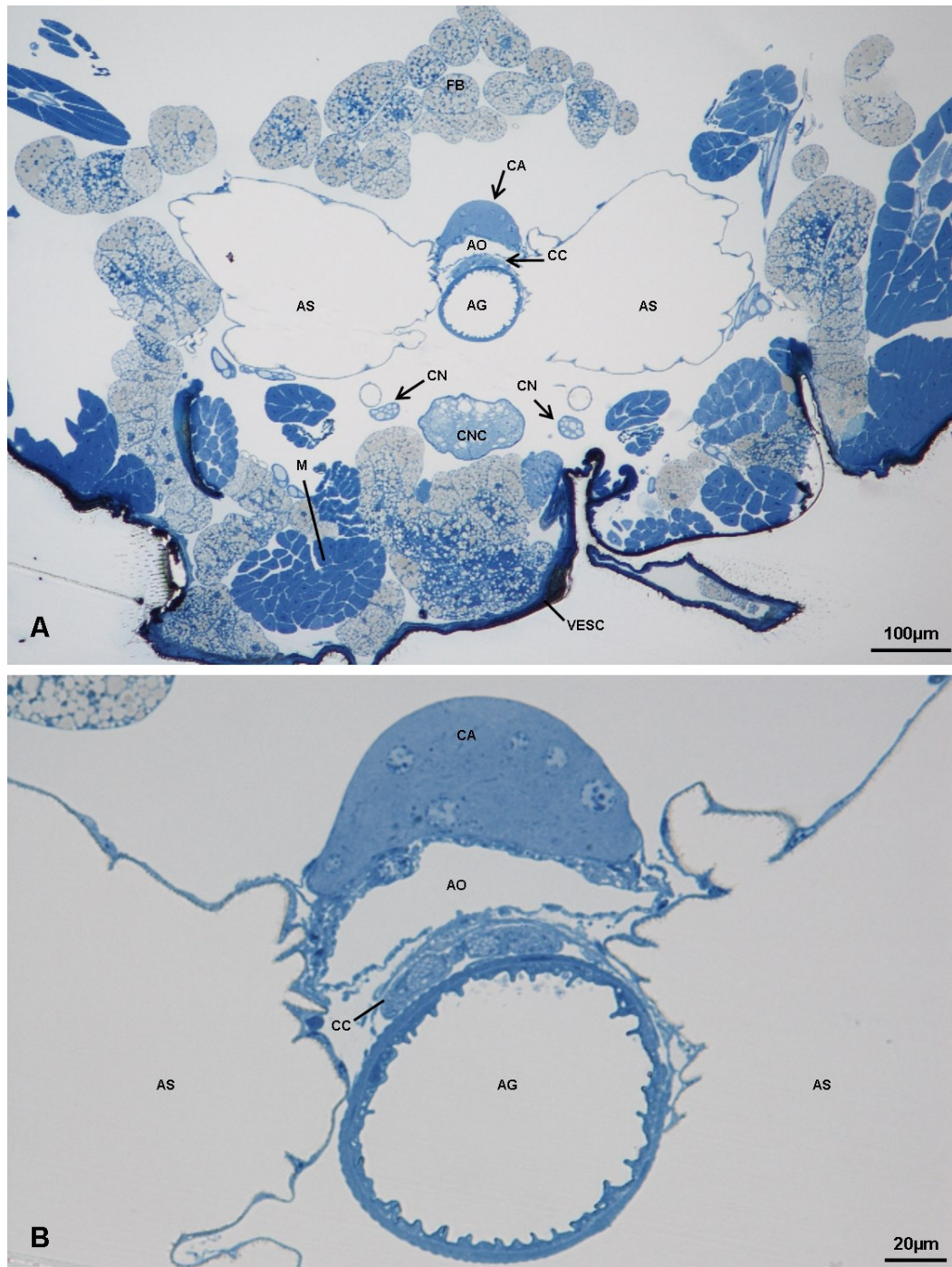


Fig. 4.42. Immagine al microscopio ottico dell'anello di Weismann di una femmina adulta di *M. domestica*. [A] Sezione trasversale a livello del protorace che mostra la posizione dell'anello di Weismann. [B] Dettaglio dell'immagine precedente. FB: corpi grassi; CA: corpora allata; AO: aorta; CC: corpora cardiaca; AG: intestino anteriore; AS: sacco aereo; CNC: cordone nervoso cefalotoracico; CN: nervo cervicale; M: muscoli; VESC: scleriti ventrali.

T0 (sfarfallamento)

La struttura dei corpora allata all'intervallo T0 è composta da 16.4 ± 1.1 cellule, con un volume complessivo di $110.8 \pm 8.4 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Al momento dello sfarfallamento la struttura è posizionata tra due ampi sacchi aerei che la delimitano lateralmente (Fig. 4.43A). A questo stadio l'ultrastruttura della ghiandola presenta lungo i margini aree circolari fortemente elettrondense ascrivibili a nuclei picnotici (Fig. 4.43B). Le cellule della ghiandola sono tutte morfologicamente molto simili e in particolare:

- i nuclei eucromatici hanno forma sferica, con eterocromatina addensata in piccoli grumi e nucleolo sferico, di norma localizzato centralmente (Fig. 4.43C);
- le membrane plasmatiche delle cellule contigue sono fortemente ravvicinate e con interdigitazioni molto fitte del plasmalemma; gli spazi intercellulari sono rari;
- il citoplasma appare caratterizzato da reticolo endoplasmatico liscio con organizzazione fittamente intricata e presenza di ribosomi liberi; in alcune aree cellulari, specialmente nelle cellule della regione corticale della ghiandola, si nota un citoplasma meno elettrondenso, in particolare attorno ai nuclei picnotici (Fig. 4.43B, D);
- i mitocondri hanno forma allungata (Fig. 4.43E).

T0P (15 ore dallo sfarfallamento, trattamento topico)

La struttura dei corpora allata all'intervallo T0P è composta da 19.4 ± 1.1 cellule, con un volume complessivo di $158.2 \pm 12.3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Al momento del trattamento (15 ore dallo sfarfallamento) in sezione trasversale la struttura è appiattita dorsoventralmente e i sacchi aerei che la delimitavano lateralmente al tempo T0 ora sono localizzati più in basso, alla stessa altezza dei corpora cardiaca (Fig. 4.43F). Anche in questo intervallo di prelievo la ghiandola presenta cellule tutte morfologicamente molto simili e in particolare:

- i nuclei hanno caratteristiche del tutto simili a quelle riscontrate al tempo T0 (Fig. 4.43G);
- le membrane plasmatiche delle cellule contigue sono fortemente ravvicinate e con interdigitazioni molto fitte del plasmalemma; in alcune aree si osservano ampi spazi intercellulari riempiti da materiale flocculento (Fig. 4.43H, I);
- il citoplasma appare più rarefatto rispetto al tempo T0 e il reticolo endoplasmatico liscio è suddiviso in zone che presentano una fitta e intricata rete di cavità tubolari (Fig. 4.43I, J);
- i ribosomi sono per lo più liberi, ma rispetto a T0 il reticolo endoplasmatico rugoso sembra più abbondante e organizzato in piccole cisterne appiattite;
- i mitocondri appaiono uniformemente distribuiti, con forma allungata o sferica e matrice elettrondensa (Fig. 4.43J).

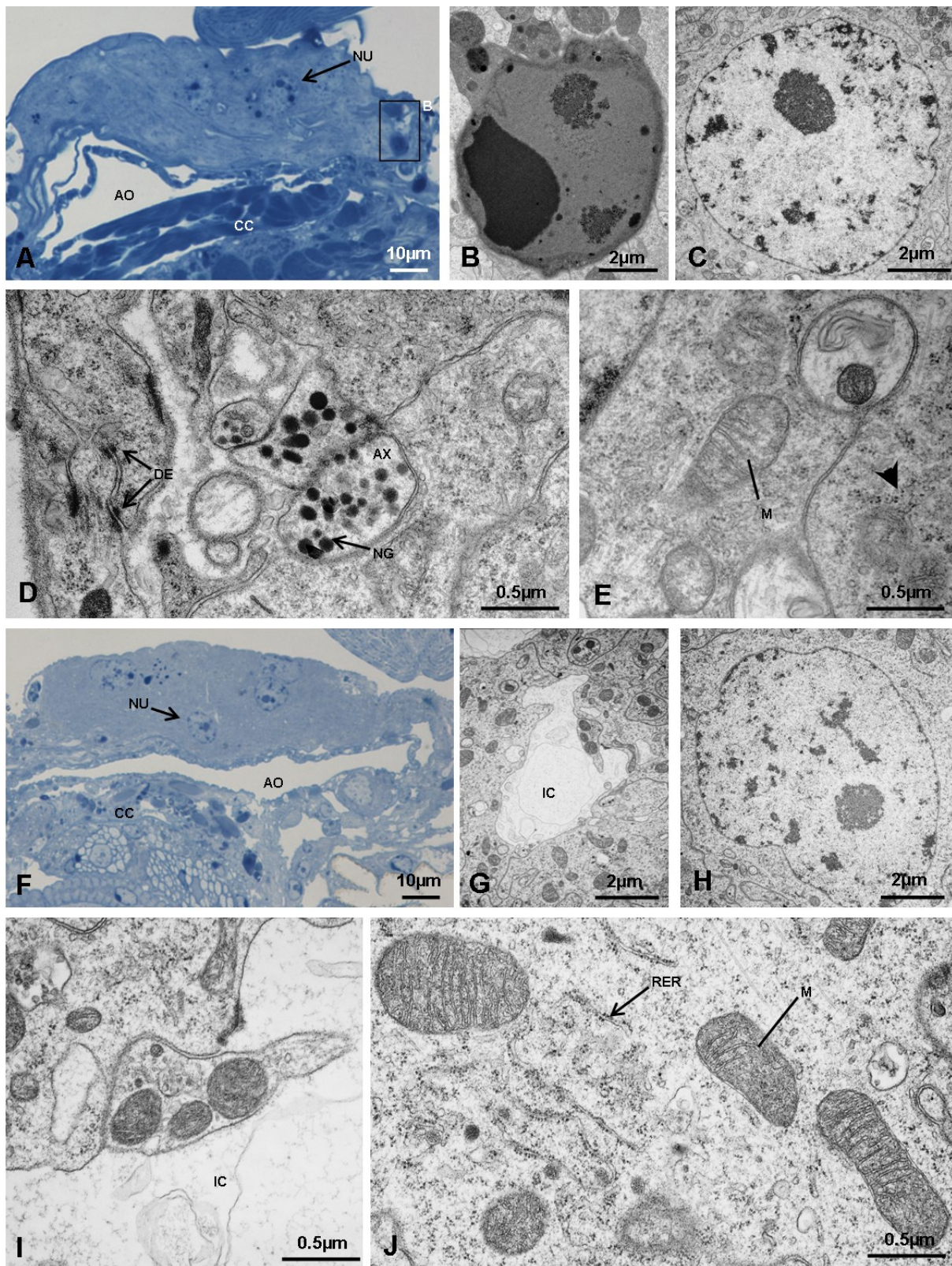


Fig. 4.43. [A] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata al tempo T0. [B-E] Immagini al TEM dei corpora allata al tempo T0. [B] Nucleo picnotico. [C] Nucleo di una cellula dei corpora allata. [D] Dettaglio del citoplasma che mostra un assone in sezione trasversale. [E] Dettaglio del citoplasma che mostra alcuni mitocondri. La freccia triangolare indica alcuni ribosomi. [F] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata al tempo T0P. [G-J] Immagini al TEM dei corpora allata al tempo T0P. [G] Nucleo di una cellula dei corpora allata. [H] Spazio intercellulare. [I] Dettaglio di uno spazio intercellulare. [J] Dettaglio del citoplasma che mostra alcuni mitocondri e il reticolo endoplasmatico rugoso. NU: nucleo; DE: desmosoma; AX: assone; NG: granulo neurosecretorio; M: mitocondri; IC: spazio intercellulare. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.42.

T1 (45 ore dallo sfarfallamento e 30 ore dal trattamento)

Controllo. La struttura dei corpora allata all'intervallo T1 è composta da 19.6 ± 1.1 cellule, con un volume complessivo di $205.6 \pm 14.4 \mu\text{m}^3$. Come al tempo T0P, i sacchi aerei sono localizzati in basso, in linea con i corpora cardiaca, e restano in questa posizione fino al tempo T3. In sezione trasversale la struttura dei corpora allata appare più sviluppata dorso-ventralmente, con altezza doppia rispetto al T0P (Fig. 4.44A). In questo intervallo di prelievo si iniziano a distinguere in microscopia ottica in resina due tipologie di cellule, cellule chiare e cellule scure, che tuttavia non sono ancora chiaramente distinguibili in microscopia elettronica (Fig. 4.44A). Le cellule scure sembrano costituire la maggior parte della ghiandola: hanno nuclei sferici, nucleoli ben visibili, citoplasmi piuttosto compatti e confini cellulari sinuosi.

Le cellule chiare sono localizzate nella regione centrale della ghiandola, hanno nuclei sferici e nucleoli ben visibili, con citoplasma meno compatto ed evidenti vescicole. A livello ultrastrutturale la differenza tra cellule chiare e scure è meno visibile: le cellule chiare hanno citoplasma più rarefatto, vescicole più chiare e mitocondri più elettrondensi (Fig. 4.44A-E).

Trattato. La struttura dei corpora allata all'intervallo di tempo T1 nei campioni trattati è composta da 17.6 ± 1.5 cellule, con un volume complessivo di $160.1 \pm 13.6 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

In sezione trasversale la struttura è appiattita dorsoventralmente e in microscopia ottica presenta un aspetto simile a quello dei corpora allata al tempo T0P (Fig. 4.44F). A questo intervallo di prelievo la principale differenza tra campioni trattati e campioni di controllo è che nei trattati non è possibile distinguere cellule chiare e scure, né in microscopia ottica né in microscopia elettronica. Le cellule che costituiscono la struttura dei corpora allata nei campioni trattati a questo intervallo di tempo hanno le seguenti caratteristiche:

- i nuclei sono sferici ed eucromatici, con eterocromatina addensata in grumi (Fig. 4.44G);
- le membrane plasmatiche sono fortemente convolute ed interdigitate, e gli spazi intercellulari sembrano assenti;
- i mitocondri appaiono piuttosto rigonfi, con segni di degenerazione che consistono in creste incomplete e frammentate; in alcuni casi appaiono in via di trasformazione in vescicole (Fig. 4.44H);
- il citoplasma è compatto, ricco di reticolo endoplasmatico liscio e ribosomi liberi (Fig. 4.44I);

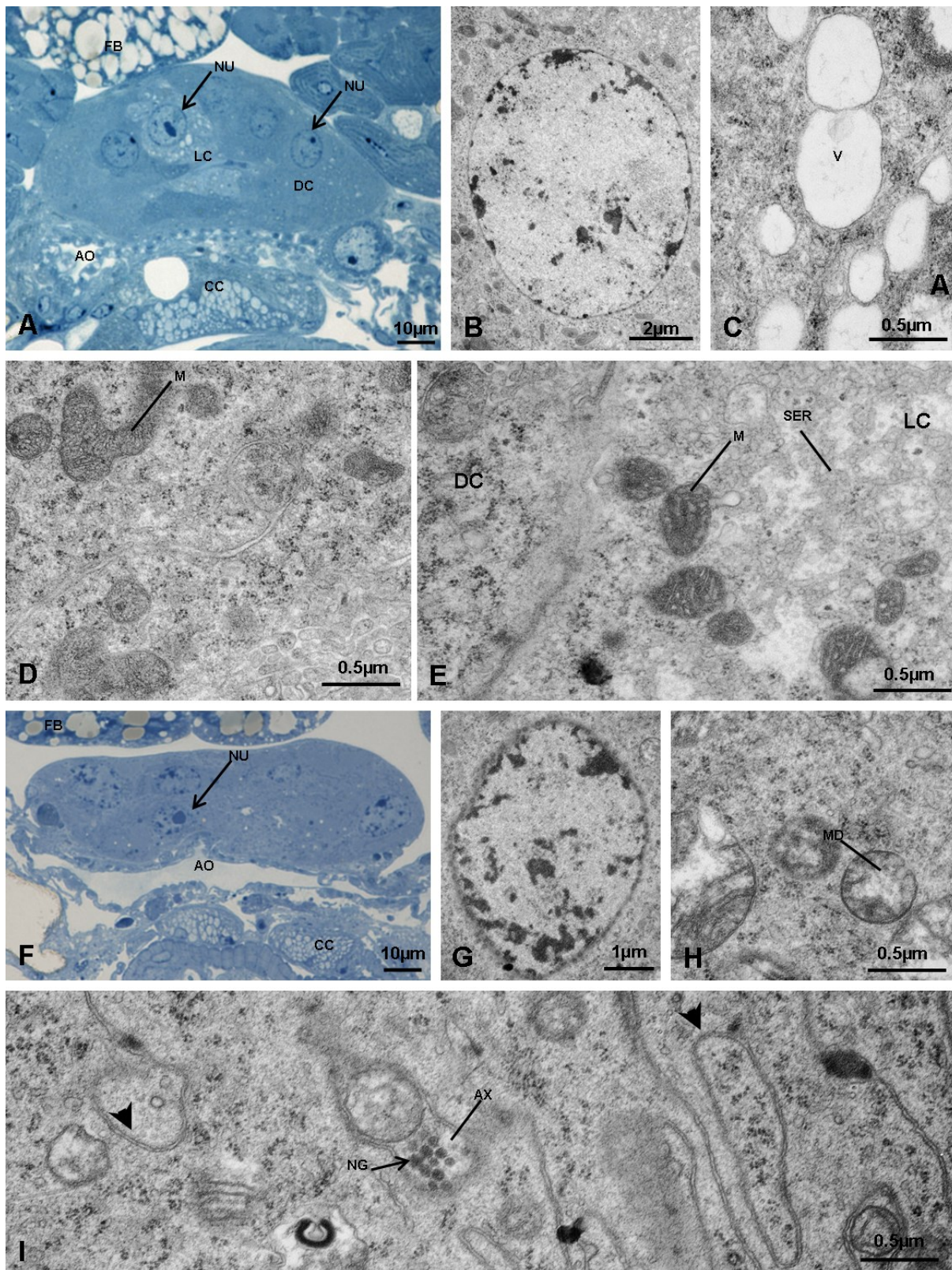


Fig. 4.44. [A] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T1. [B-E] Immagini al TEM dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T1. [B] Nucleo di una cellula scura. [C] Vescicole all'interno di una cellula chiara. [D] Dettaglio del citoplasma di una cellula scura che mostra alcuni mitocondri. [E] Transizione tra una cellula scura (a sinistra) ed una cellula chiara (a destra); la cellula chiara è caratterizzata da mitocondri elettrondensi. [F] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata di una femmina trattata al tempo T1. [G-I] Immagini al TEM dei corpora allata di una femmina trattata al tempo T1. [G] Nucleo di una cellula dei corpora allata. [H]. Dettaglio del citoplasma che mostra mitocondri rigonfi e in corso di degenerazione. [I] Dettaglio del citoplasma che mostra un assone e membrane che si interdigitano tra loro. La freccia triangolare indica le membrane plasmatiche che si interdigitano tra loro.; LC: cellula chiara; DC: cellula scura; V: vescicole; SER: reticolo endoplasmatico liscio; MD: mitocondri in degenerazione. Altre abbreviazioni come in Fig. 4.42 e 4.43.

T2 (70 ore dallo sfarfallamento e 55 ore dal trattamento)

Controllo. La struttura dei corpora allata all'intervallo T2 è composta da 19.8 ± 1.3 cellule, con un volume complessivo di $323.4 \pm 17.8 \mu\text{m}^3$, quindi significativamente ($p < 0.05$) più elevato rispetto a tutti gli altri tempi di prelievo (Tabella 4.23). In sezione trasversale i corpora allata presentano forma semilunare (Fig. 4.45A). Come al tempo T1, è possibile distinguere due tipi di cellule, le cellule chiare e le cellule scure, questa volta sia in microscopia ottica sia in microscopia elettronica. I confini tra questi due tipi di cellule sono fortemente interdigitati (Fig. 4.45B). Le cellule scure costituiscono la maggior parte della ghiandola, presentano nuclei sferici eucromatici con eterocromatina addensata in piccoli grumi (Fig. 4.45A). Il citoplasma è compatto, ricco di reticolo endoplasmatico liscio e ribosomi liberi. I mitocondri hanno generalmente forma allungata e matrice elettrodensa. Le membrane plasmatiche sono molto ravvicinate tra loro e sembrano mancare gli spazi intercellulari (Fig. 4.45B, C). Le cellule chiare sono localizzate sia a livello corticale sia a livello centrale, e sono caratterizzate da un nucleo sferico eucromatico con eterocromatina distribuita in grumi e nucleolo ben formato (Fig. 4.45A). Il citoplasma è molto rarefatto e in esso non è possibile distinguere chiaramente la morfologia del reticolo endoplasmatico liscio o rugoso. E' presente un elevato numero di vescicole sferiche di dimensioni variabile e ribosomi liberi (Fig. 4.45B, D). I mitocondri hanno forme molto variabili, matrice fortemente elettrodensa e creste tubolari che si intrecciano ed appaiono in sezione con spazi interni ovali e circolari (Fig. 4.45E).

Trattato. La struttura dei corpora allata all'intervallo di tempo T2 nei campioni trattati è composto da 17.4 ± 0.89 cellule, con un volume complessivo di $184.4 \pm 17.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. La principale differenza tra le strutture dei corpora allata delle femmine trattate rispetto a quelle di controllo a questo intervallo di prelievo è il volume complessivo, che risulta significativamente ($p < 0.05$) inferiore nei trattati. In alcuni casi la ghiandola appare attraversata da ampie lacune sia centrali sia corticali, in altri casi l'alterazione è individuabile solo tramite microscopia elettronica (Fig. 4.45F, G). Come nel precedente intervallo di tempo, non sono distinguibili cellule chiare e cellule scure. Le cellule che compongono la ghiandola a questo intervallo di prelievo presentano nuclei rotondeggianti, prevalentemente eucromatici con eterocromatina organizzata in grumi e nucleolo sferico centrale (Fig. 4.45F, G), citoplasma con aspetto molto simile a quello dei campioni trattati al tempo T1, con la sola differenza che in alcune regioni della ghiandola le cellule hanno citoplasmi rarefatti (Fig. 4.45H), e mitocondri rigonfi e fortemente alterati, come osservato nelle femmine trattate al tempo T1 (Fig. 4.45I).

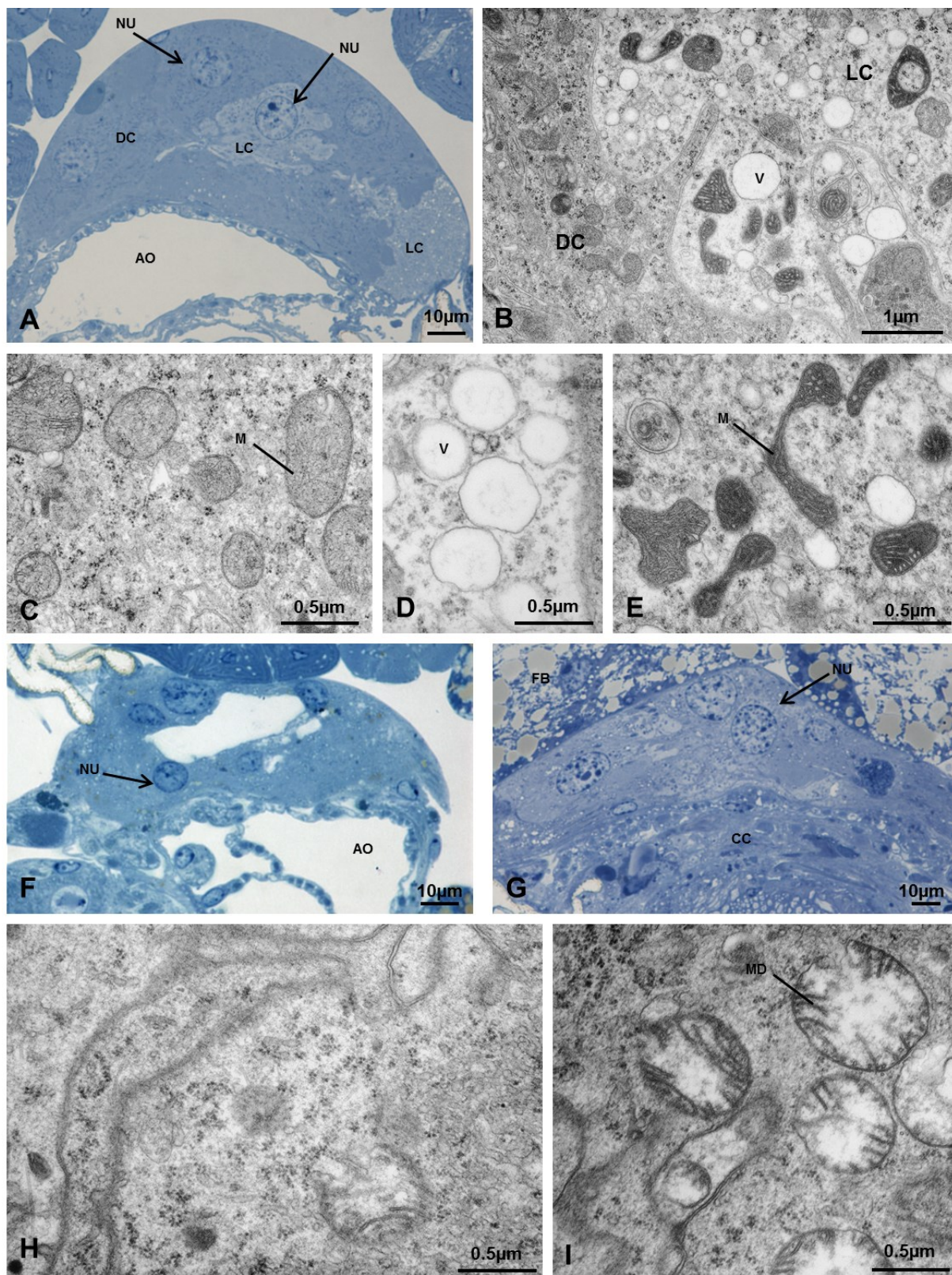


Fig. 4.45. [A] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T2. [B-E] Immagini al TEM dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T2. [B] Interfaccia tra cellule scure e chiare. [C] Dettaglio del citoplasma di una cellula scura che mostra alcuni mitocondri. [D] Vescicole all'interno di una cellula chiara. [E] Dettaglio del citoplasma di una cellula chiara che mostra alcuni mitocondri. [F] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata di una femmina trattata al tempo T2, che mostra ampi spazi centrali. [G] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata di una femmina trattata al tempo T2. [H] Immagine al TEM del citoplasma di una cellula dei corpora allata di una femmina trattata al tempo T2. [I] Immagine al TEM del citoplasma di una cellula dei corpora allata di una femmina trattata al tempo T2, che mostra mitocondri rigonfi e in corso di degenerazione. Abbreviazioni come in Fig. 4.42, 4.43 e 4.44.

T3 (90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento)

Controllo. La struttura dei corpora allata all'intervallo T3 è composta da 19.8 ± 1.3 cellule, con un volume complessivo di $214.1 \pm 24 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. In sezione trasversale la struttura presenta forma semilunare come al tempo T2 (Fig. 4.46A), ma con dimensioni significativamente inferiori ($p < 0.05$) (Tabella 4.23). A questo intervallo di prelievo non è più possibile distinguere i due tipi di cellule, chiare e scure, né in microscopia ottica né in microscopia elettronica. Le caratteristiche di tutte le cellule che compongono la ghiandola al tempo T3 sono le seguenti:

- i nuclei sono sferici ed eucromatici, con eterocromatina addensata in grumi nei pressi dell'involucro nucleare e nucleolo ben evidente (Fig. 4.46A);
- il citoplasma è caratterizzato da abbondante reticolo endoplasmatico liscio a distribuzione eterogenea, che determina aree dense ed aree rarefatte localizzate in particolare intorno ai nuclei e alla zona corticale della ghiandola; vi sono inoltre numerosi ribosomi liberi (Fig. 4.46B, C);
- i mitocondri appaiono prevalentemente con matrice scura (Fig. 4.46B, inserto): nelle cellule della zona corticale ventrale della ghiandola alcuni mitocondri sono rigonfi e con creste frammentate, in particolare in corrispondenza delle aree di citoplasma rarefatto (Fig. 4.46C, inserto).

Trattato: la struttura dei corpora allata all'intervallo di tempo T3 nei campioni trattati è composta da 18.0 ± 1.0 cellule, con un volume complessivo di $153.8 \pm 21.1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

In questo intervallo di tempo i corpora allata delle femmine trattate presentano quadri morfologici fortemente alterati, chiaramente distinguibili anche in microscopia ottica.

Le principali alterazioni individuate in questo intervallo di prelievo sono ampie lacune e cellule con citoplasma pieno di vescicole di varie dimensioni (Fig. 4.46D-G). In microscopia elettronica è possibile individuare le seguenti alterazioni:

- i nuclei sono fortemente deformati, con involucri molto irregolari e talvolta nettamente digitiformi; appaiono eterocromatici, con eterocromatina aggregata in grumi e bande, che tende a posizionarsi in prossimità dell'involucro nucleare (Fig. 4.47A-B);
- il citoplasma appare eterogeneo, con zone molto chiare contenenti materiale flocculento che in alcuni casi comprende mitocondri con chiari segni di degenerazione; vi sono zone elettrondense costituite da reticolo endoplasmatico liscio con ribosomi liberi (Fig. 4.47C-D); altre zone appaiono omogeneamente ricche di vescicole sferiche di dimensioni variabili (Fig. 4.47E, F). Data la forte abbondanza di vescicole e le ampie aree di citoplasma di colore chiaro, risulta molto difficile individuare i confini cellulari. Le zone di citoplasma rarefatto e ricco di vescicole si estendono fino alla tunica, ai margini della ghiandola (Fig. 4.47C).

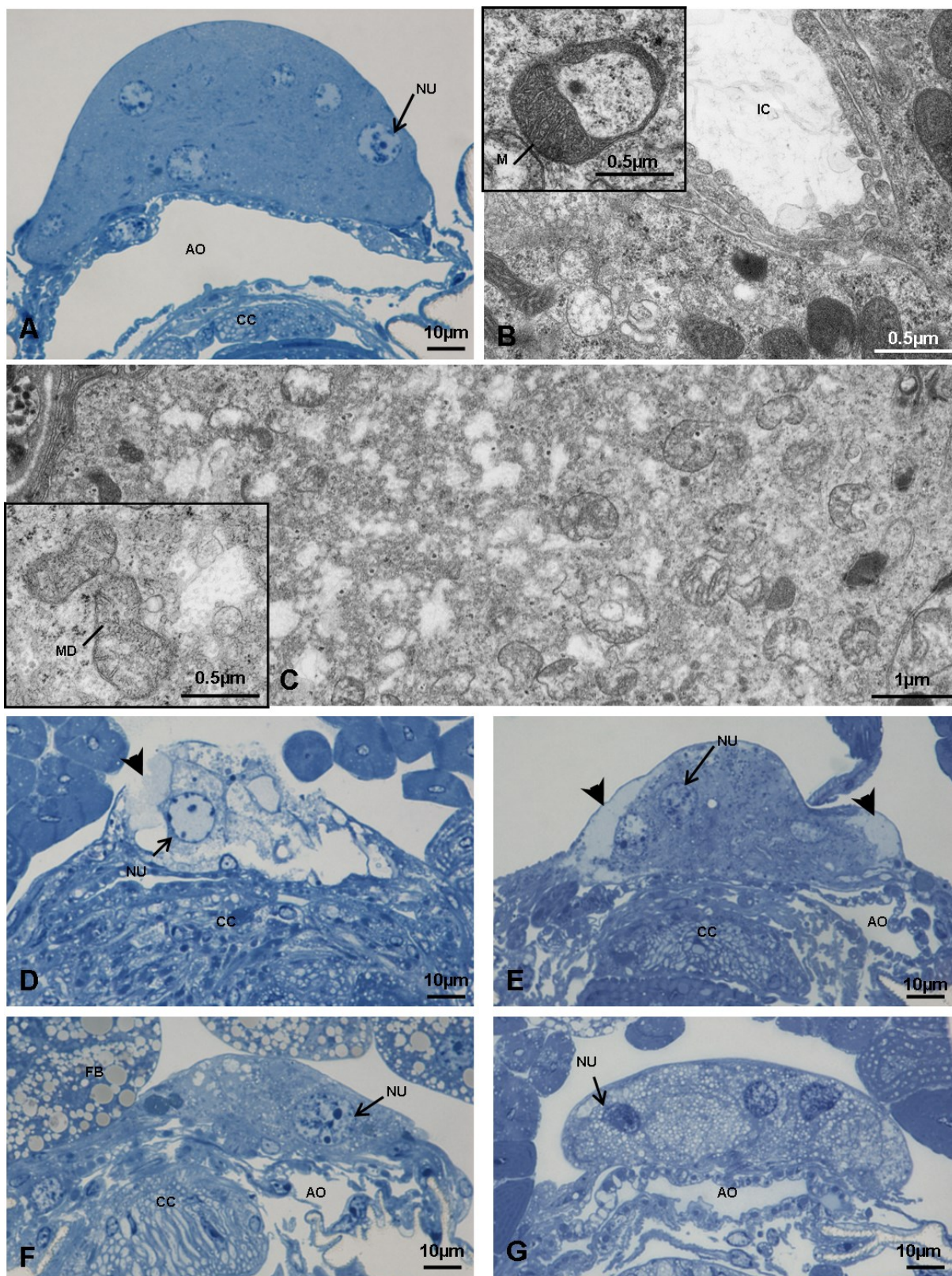


Fig. 4.46. [A] Immagine al microscopio ottico dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T3. [B] Immagine al TEM del citoplasma di una cellula dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T3; l'inserto mostra un mitocondrio con matrice fortemente elettrodensa. [C] Immagine al TEM del citoplasma rarefatto di una cellula dei corpora allata di una femmina di controllo al tempo T3; l'inserto mostra mitocondri rigonfi. [D-G] Immagini al microscopio ottico dei corpora allata di quattro femmine trattate al tempo T3. Le frecce triangolari indicano spazi anomali. Abbreviazioni come in Fig. 4.42, 4.43 e 4.44.

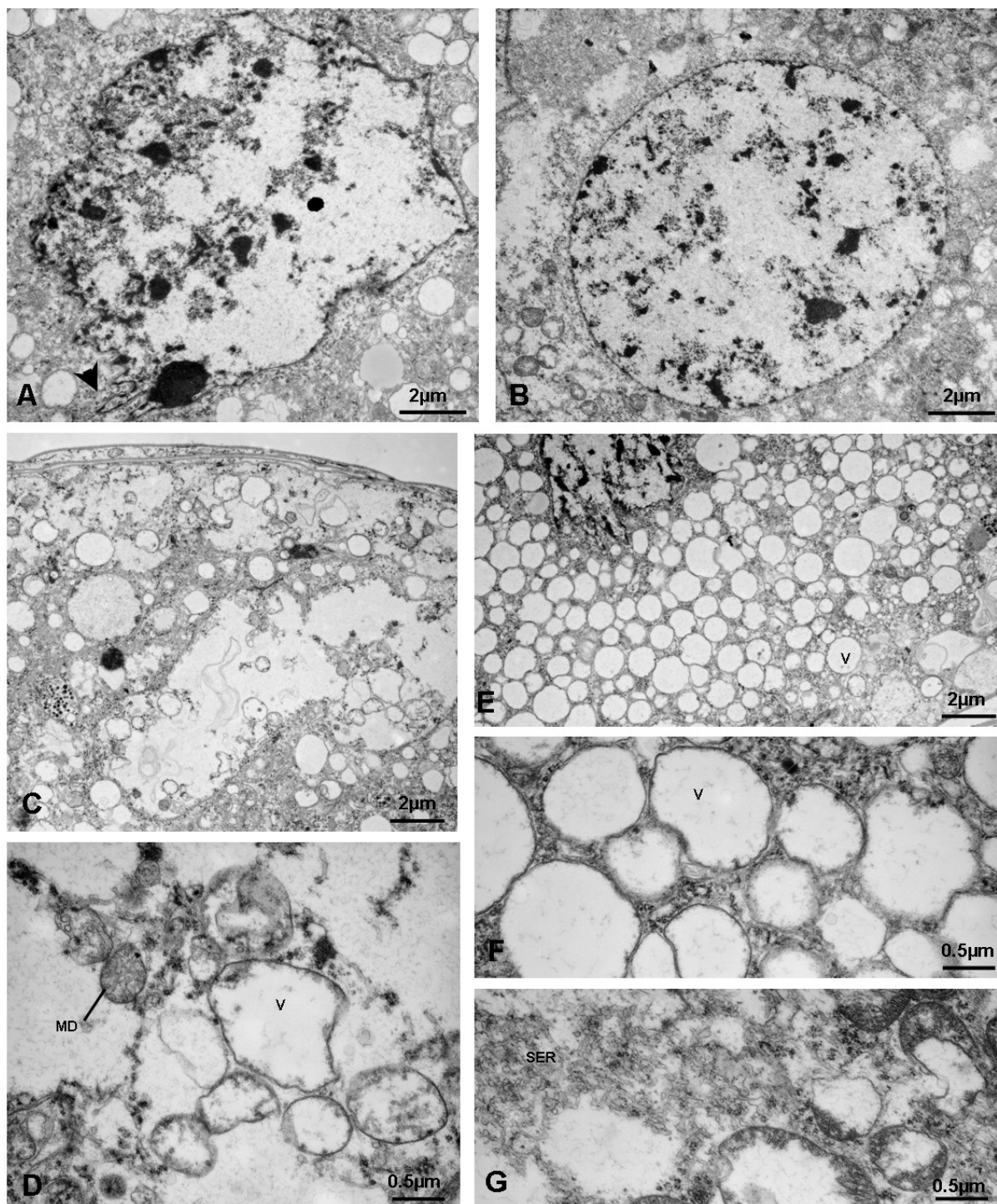


Fig. 4.47. [A-G] Immagini al TEM dei corpora allata di femmine trattate al tempo T3. [A] Nucleo con involucro nucleare digitiforme, indicato da una freccia triangolare. [B] Nucleo con involucro nucleare rotondeggiante. [C] Citoplasma eterogeneo con regioni molto chiare contenenti un materiale flocculento. [D] Dettaglio delle aree rarefatte all'interno del citoplasma eterogeneo. [E] Dettaglio di aree meno rarefatte all'interno del citoplasma eterogeneo. [F] Citoplasma con omogenea distribuzione di vescicole rotondeggianti di dimensioni variabili. [G]. Dettaglio delle vescicole chiare di forma rotonda nel citoplasma. LA: lamina al bordo della ghiandola. Abbreviazioni come in Fig. 4.42, 4.43 e 4.44.

4.9.2 Analisi volumetrica e conteggio cellulare dei corpora allata

I dati riguardanti il volume medio della struttura dei corpora allata in femmine di controllo e femmine trattate con diofenolan sono indicati nella Tabella 4.23.

L'analisi statistica (ANOVA ad una via a confronti pianificati), effettuata sui dati del volume medio dei corpora allata, ha evidenziato la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) tra:

- il tempo T0 (sfarfallamento) e il tempo T0P (15 ore dallo sfarfallamento);
- il tempo T0P e il controllo al tempo T1 (45 ore dallo sfarfallamento);
- il controllo al tempo T1 ed il controllo al tempo T2 (70 ore dallo sfarfallamento);
- il controllo al tempo T2 ed il controllo al tempo T3 (90 ore dallo sfarfallamento);
- il controllo e il trattato al tempo T1, T2 e T3;
- il trattato al tempo T1 e il trattato al tempo T2.

In base all'analisi statistica è possibile evidenziare un aumento significativo ($p < 0.05$) nel volume dei corpora allata tra il T0 e il T0P. Nel controllo l'aumento procede fino ad un picco di $323.4 \pm 17.8 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ al tempo T2, per poi diminuire significativamente ($p < 0.05$) al tempo T3. Nel trattato non si evidenzia un aumento significativo ($p > 0.05$) tra T0P e T1.

Il T2, nonostante presenti un volume significativamente ($p < 0.05$) più elevato rispetto al T1 e al T3, non presenta un picco di volume paragonabile a quello evidenziato nel controllo allo stesso intervallo di tempo (Fig. .4.48)

I risultati del conteggio delle cellule che costituiscono i corpora allata in femmine di controllo e femmine trattate con diofenolan sono indicati nella Tabella 4.23. L'analisi statistica (ANOVA ad una via a confronti pianificati) effettuata sul numero medio di cellule ha evidenziato la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) tra:

- il tempo T0 (sfarfallamento) e il tempo T0P (15 ore dallo sfarfallamento);
- il tempo T0P e il controllo al tempo T1 (45 ore dallo sfarfallamento);
- il tempo T0P e il trattato al tempo T1;
- il controllo e il trattato nei tempi T1, T2 (70 ore dallo sfarfallamento) e T3 (90 ore dallo sfarfallamento).

Non sono state evidenziate differenze significative ($p > 0.05$) tra il numero medio di cellule costituenti i corpora allata tra i tempi T1, T2 e T3, sia nei controlli sia nei trattati. L'analisi statistica rivela inoltre un aumento significativo del numero di cellule dei corpora allata tra il tempo T0 e il tempo T0P. Nei controlli il numero di cellule si mantiene costante ai tempi T1, T2 e T3, mentre nei trattati il numero di cellule diminuisce significativamente tra T0P e T1, per poi mantenersi costante fino al tempo T3 (Fig. .4.49)

Ore trascorse dallo sfarfallamento		Volume medio dei corpora allata (μm^3) \pm DS	Numero medio di cellule \pm DS
T0 (0 ore)	---	$110.8 \pm 8.4 \times 10^3$	16.4 ± 1.1
T0P (15 ore) ^(a)	---	$158.2 \pm 12.3 \times 10^3$	19.4 ± 1.1
T1 (45 ore)	Controllo	$205.6 \pm 14.4 \times 10^3$	19.6 ± 1.1
	Trattato	$160.1 \pm 13.6 \times 10^3$	17.6 ± 1.5
T2 (70 ore)	Controllo	$323.4 \pm 17.8 \times 10^3$	19.8 ± 1.3
	Trattato	$184.4 \pm 17.2 \times 10^3$	17.4 ± 0.9
T3 (90 ore)	Controllo	$214.1 \pm 24 \times 10^3$	19.8 ± 1.3
	Trattato	$153.8 \pm 21.1 \times 10^3$	18.0 ± 1.0

Tabella 4.23. Numero medio di cellule dei corpora allata \pm DS e volume medio dei corpora allata \pm DS (in μm^3) in femmine di controllo e trattate, nei diversi intervalli di tempo (T0, T0P, T1, T2, T3). Per ciascun intervallo di tempo sono state esaminate 5 femmine di controllo e 5 trattate.

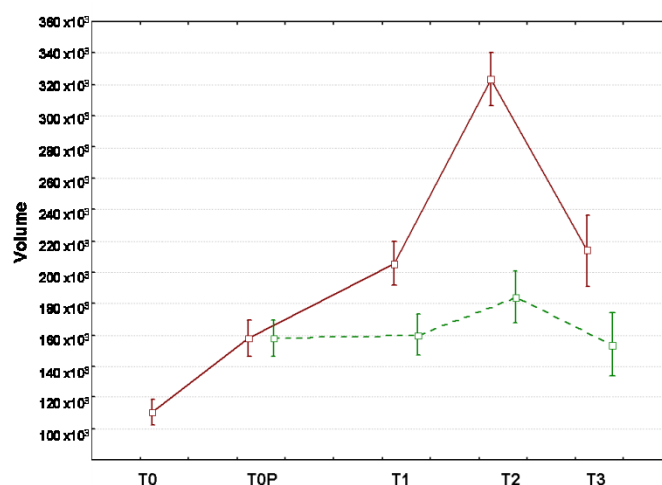


Fig. 4.48. Volume medio dei corpora allata \pm DS (in μm^3) in femmine di controllo (linea continua) e femmine trattate (linea tratteggiata) a diversi intervalli di tempo (vedi Tabella 4.23).

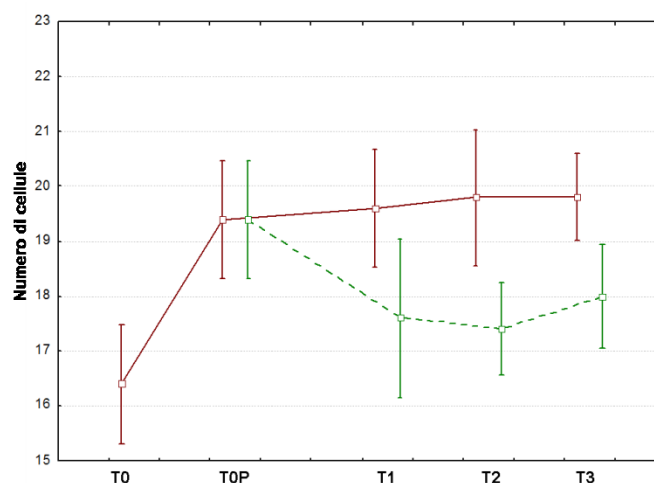


Fig. 4.49. Numero medio di cellule \pm DS nei corpora allata di femmine di controllo (linea continua) e femmine trattate (linea tratteggiata) a diversi intervalli di tempo (vedi Tabella 4.23).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I primi test effettuati hanno riguardato la mortalità del ceppo s-DBF di *Musca domestica* esposto a varie concentrazioni di diofenolan. Come illustrato nella Fig. 4.1 e Tabella 4.1, la mortalità di questo ceppo sensibile aumenta all'aumentare della dose di diofenolan: tra i due valori di LD, il primo (LD_{50}) è circa 1/5 del secondo (LD_{90}). Questi risultati sono simili a quelli osservati da Abahussain (2006) per RH-5849, un agonista dell'ecdisterone.

Per quanto riguarda lo stadio maggiormente colpito dal diofenolan, la mortalità indotta dall'esposizione al principio attivo è essenzialmente una mortalità pupale, perché quella larvale è solo 2%. Riguardo alla mortalità nello stadio pupale, si possono osservare effetti-dose dipendenti fino ad un massimo del 96% per la dose più alta (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Tuttavia ad alte dosi non si ha neppure sfarfallamento, poiché l'adulto non è in grado di emergere dal pupario. Questi effetti sono molto simili a quelli riscontrati in *M. domestica* dopo trattamento con ciromazina, un inibitore della sintesi della chitina (Awad e Mulla, 1984). Se si apre il pupario da cui l'adulto non è sfarfallato, si può osservare che l'adulto rimasto al suo interno è completamente sviluppato. A dosi più basse di diofenolan gli adulti iniziano ad emergere, ma restano intrappolati nel pupario. Una possibile spiegazione è che i pupari abbiano anomalie morfologiche che impediscano l'uscita completa dell'adulto, ma gli stessi effetti (incompleta uscita dal pupario con trattamento a basse dosi di diofenolan), si osservano anche in pupari apparentemente senza malformazioni, almeno osservabili macroscopicamente. In effetti il pupario apparentemente normale ha in realtà anomalie riscontrabili al microscopio elettronico a scansione (SEM), in particolare a livello delle piastre respiratorie. Queste anomalie sono riscontrabili anche nelle larve trattate. Si può quindi supporre che le anomalie delle piastre respiratorie causino un deficit energetico nell'insetto al momento cruciale dell'uscita dal pupario. L'adulto già formato, ma indebolito per il deficit respiratorio, potrebbe non essere in grado di rompere con lo ptilino la parte anteriore del pupario. Naturalmente è possibile supporre che vi siano altre malformazioni del pupario che impediscano l'uscita corretta dell'insetto, come ad esempio ispessimenti anomali oppure linee di frattura alterate, in modo simile a quanto riscontrato nelle pupe exarate del coleottero *Tenebrio molitor* trattato con diflubenzuron, inibitore della sintesi della chitina (Soltani et al., 1989). Queste considerazioni riguardano i pupari la cui forma è apparentemente normale e del tutto simile a quella dei pupari di controllo. L'altro tipo di pupari che si riscontra nei trattati è il pupario larviforme, che presenta evidenti anomalie anche all'esame macroscopico poiché mantiene un aspetto simile a quello di una larva (da cui il nome). E' chiaro come un pupario deformato possa impedire all'adulto di uscire in modo corretto. Stranamente il numero dei pupari larviformi

sul totale dei pupari dei trattati è risultato molto inferiore, al contrario di quanto precedentemente descritto da Awad e Mulla (1987). Tuttavia anche questi pupari hanno anomalie nelle piastre respiratorie: si può supporre quindi che l'animale, già indebolito per il deficit respiratorio, non riesca ad emergere completamente a causa delle altre anomalie del pupario, in particolare a carico della cuticola. Anomalie della superficie cuticolare del pupario sono state riscontrate in *M. domestica* e *Chrysomya megacephala* trattate con estratto di neem (*Azadirachta indica*) (Siriwattananarungsee et al., 2008).

Non si può inoltre escludere che il diofenolan, in qualità di analogo dell'ormone giovanile, possa interferire con l'attività dell'ormone della schiusa ("eclosion hormone").

Nei test preliminari di fecondità, le tre dosi più alte di trattamento sono risultate le più efficaci, senza differenze significative tra loro. La dose più alta è stata scelta per gli esperimenti successivi.

Gli effetti del diofenolan alla dose più alta sono stati esaminati a diversi intervalli di tempo a partire dallo sfarfallamento: T0 (sfarfallamento), T0P (15 ore dopo sfarfallamento, momento del trattamento topico), T1 (45 ore dallo sfarfallamento, 30 ore dal trattamento), T2 (70 ore dallo sfarfallamento, 55 ore dal trattamento) e T3 (90 ore dallo sfarfallamento, 75 ore dal trattamento). A tutti gli intervalli di tempo (esclusi T0 e T0P) alcune alterazioni generali sono state rilevate all'interno degli ovaroli, consistenti principalmente in eventi di degenerazione (atresia) (Trepte e Trepte-Feuerborn, 1980) e ipertrofia. Queste alterazioni sono state rilevate nel follicolo primario (atresia) e nel follicolo secondario (atresia o ipertrofia).

Nessun danno è stato evidenziato a carico del germario, molto probabilmente perché già a 15 ore dallo sfarfallamento quasi tutte le trasformazioni fisiologiche a carico del germario sono state completate e quindi l'esposizione all'insetticida non poteva influenzare lo sviluppo del follicolo terziario. Infatti le femmine adulte di *M. domestica* possono deporre per 3 o al massimo 4 cicli gonotrofici. A causa della presenza di ovaroli con estese degenerazioni, gli altri ovaroli potevano crescere in modo anomalo, causando una perdita di sincronia ed una eterogeneità nella maturazione degli ovaroli all'interno dello stesso ovario

Le alterazioni degli ovaroli possono essere riassunte in 9 diversi morfotipi: 1 e 2 (variante A e variante B) al tempo T1; 3, 4, e 5 al tempo T2; 6, 7, 8, 9 al tempo T3. Riguardo ai cerchi concentrici dell'ovario formati dagli ovaroli, la mappatura non ha rilevato differenze significative tra femmine di controllo e femmine trattate nel numero di ovaroli all'interno dello stesso cerchio. Il numero medio di ovaroli all'interno dell'ovario è costante nei diversi intervalli di tempo: questo suggerisce che il trattamento con diofenolan non abbia causato degenerazioni tali da determinare la perdita di interi ovaroli.

Tramite analisi comparata di tutti i morfotipi riscontrati ai vari tempi di prelievo sono stati individuati tre “percorsi di trasformazione” degli ovariole a partire dal tempo T0P (Fig. 4.31). Nel primo percorso, detto di “degenerazione precoce”, si osserva la degenerazione totale del follicolo primario tra T0P e T1, seguita dall’ipertrofia del follicolo secondario. Nel secondo percorso, detto di “degenerazione intermedia”, si osserva la degenerazione totale del follicolo secondario tra T1 e T2 (probabilmente iniziata in T1), mentre il follicolo terziario procede nel suo sviluppo. Nel terzo percorso, detto di “degenerazione/ipertrofia”, il follicolo secondario che mostra segni di ipertrofia in T2 può svilupparsi tra T2 e T3 in due modi: nel primo caso procede nell’ipertrofia e diventa quindi un follicolo secondario anormalmente grande, nel secondo caso può andare incontro a degenerazione, lasciando spazio per lo sviluppo del follicolo terziario, come indicato nella Fig. 4.31. Il più frequente tra i tre “percorsi di trasformazione” dell’ovariole è il secondo percorso, tipico del morfotipo 7 in T3. Le lievi alterazioni osservate nel follicolo primario non sembrano influenzare lo sviluppo di questo follicolo e il primo ciclo gonotrofico, in accordo con i dati sul numero di uova deposte e sulla percentuale di schiusa, ma queste alterazioni hanno effetto sul secondo e sul terzo ciclo gonotrofico.

Questi dati permettono di formulare la seguente ipotesi: l’attività maggiore del diofenolan, in qualità di insetticida analogo del JH, si esplica, probabilmente, sul lungo periodo, come già riscontrato nel lepidottero *Papilio demoleus*, in cui l’insetticida esercita un effetto inibitorio nei confronti degli stadi avanzati del ciclo vitale (Singh e Kumar, 2011). E’ probabile quindi che da un punto (o più punti) iniziale/i di danno, non facilmente rilevabile, le alterazioni si diramino e continuino a diffondersi in vari distretti corporei per lungo tempo, con un effetto “a cascata”. Non si osserva infatti un singolo evento di degenerazione, ma tre differenti eventi di atresia che appaiono in momenti diversi tra loro: il primo tra T0 e T1, il secondo che inizia con T1 e si rende evidente da T2 in poi, e il terzo che avviene tra T2 e T3.

Riguardo alle uova deposte e schiuse per ogni ciclo gonotrofico, i risultati mostrano che le femmine trattate erano in grado di deporre uova (con un numero medio simile a quello dei controlli) solo nel primo ciclo gonotrofico. I tre percorsi di trasformazione ovariale indotti dal diofenolan sono in accordo con i dati ottenuti nella seconda serie di esperimenti riguardanti la fecondità. Le alterazioni principali a livello morfologico riscontrate nel follicolo secondario sono in accordo con il rapido declino nel numero di uova deposte nel secondo ciclo gonotrofico. Riguardo al follicolo terziario è probabile che gli effetti del diofenolan si esercitino anche su questo follicolo, dato che il numero di uova deposte nel terzo ciclo gonotrofico diminuisce ulteriormente.

Le alterazioni interovariolari consistono in una perdita di sincronia tra gli ovaroli, necessaria per una corretta sequenza di deposizione delle uova: la perdita di sincronia è probabilmente dovuta ad una diversa risposta al diofenolan da parte di ciascun ovarolo, non ancora del tutto compresa. Questa diversa risposta è evidenziabile anche dai risultati della mappatura dei morfotipi degli ovaroli, dove non è stata evidenziata una particolare distribuzione dei morfotipi all'interno dello stesso ovario e tra un ovario e quello controlaterale.

Forse il follicolo secondario, ipertrofico e apparentemente funzionale, può continuare il suo sviluppo, ma la perdita di sincronia con gli altri ovaroli non determina solo anomalie nel follicolo, ma anche un'ostruzione meccanica alla deposizione delle uova. Infatti queste ultime non riescono ad attraversare in modo regolare l'ovidutto e restano "ingolfate" in queste strutture anatomiche. Le femmine trattate che deponevano un numero molto basso di uova (o nessun uovo) nel secondo e nel terzo ciclo gonotrofico sono state trovate morte con l'addome rigonfio e l'ovopositore esteso. La dissezione di queste femmine trattate ha rivelato una sovrapposizione disordinata dei follicoli all'interno degli ovaroli (Fig. 4.38). Apparentemente, quindi, gli effetti sul lungo termine del diofenolan comprendono anche effetti meccanici: questo tipo di attività dell'insetticida è molto interessante e merita ulteriori studi futuri.

Per quanto riguarda la schiusa delle uova, è evidente una notevole differenza tra la percentuale di uova schiuse nei controlli (circa 100%) e quelle schiuse nelle femmine trattate all'avanzare dei cicli gonotrofici (circa 24%). Considerando quindi i dati di uova deposte e di uova schiuse, insieme a quelli sull'inibizione della fecondità nel secondo ciclo gonotrofico, si nota che la percentuale di inibizione è del 67%: quindi, a fronte di una percentuale di uova deposte pari al 33% (circa 1/3 del totale rispetto ai controlli), solo il 49% di queste uova si è schiuso, riducendo la capacità riproduttiva delle femmine trattate a 1/6 di quella iniziale. L'indice di sterilità sale quindi dal 41% fino all'83% nel secondo ciclo gonotrofico.

Per quanto riguarda il terzo ciclo gonotrofico, l'inibizione della fecondità sale al 75%, quindi la percentuale di uova deposte rispetto al controllo è 25% (1/4): poiché tra queste uova la percentuale di schiusa è, a sua volta, del 25%, se ne deduce che la riduzione della capacità riproduttiva nelle femmine trattate è pari ad 1/16 di quella dei controlli al terzo ciclo gonotrofico. Questi dati sono in accordo con l'indice di sterilità (94% nel terzo ciclo gonotrofico) e dimostrano come il diofenolan sia particolarmente efficiente nel colpire la capacità riproduttiva di *M. domestica*, in termini di deposizione delle uova e loro schiusa.

E' interessante notare come l'analisi ultrastrutturale al SEM non evidenzi alcuna apparente anomalia nella superficie delle uova deposte dalle femmine trattate, sebbene queste uova poi non si schiudano e presentino al loro interno embrioni ad uno stadio avanzato di sviluppo.

Anche i dati di interferenza dell'insetticida con la capacità riproduttiva di *M. domestica* sono in accordo con l'ipotesi precedentemente avanzata, cioè che il diofenolan agisca a vari livelli (compreso lo sviluppo embrionale) e per un periodo di tempo prolungato.

E' noto come gli ecdisteroidi, ormoni della muta, siano prodotti nell'insetto adulto principalmente a livello delle cellule follicolari dell'ovario (Delbecque et al., 1990; Telfer, 2009) e abbiano un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'ovario, particolarmente per quanto riguarda la sintesi di vitellogenina, la discesa della cisti germinale nel vitellario e la crescita dell'oocita durante la previtellogenesi e la vitellogenesi (Nijhout, 1994). Per quanto riguarda gli adulti di *M. domestica* i dati sono limitati (Agui et al., 1985; Adams e Li, 1998) e per gli insetticidi regolatori della crescita (IGR), compresi gli analoghi dell'ormone giovanile, è noto che agiscono generalmente interferendo con i livelli degli ecdisteroidi (Soltani et al., 2002; Taibi et al., 2003; Aribi et al., 2006).

In questo studio il contenuto di ecdisteroidi, misurato mediante EIA, nelle femmine di controllo, presenta un picco iniziale al tempo T0, a differenza di quanto precedentemente riportato (Adams et al., 1985). Il picco è presumibilmente dovuto all'accumulo di ecdisteroidi durante lo stadio pupale, seguito da una discesa al tempo T0P (15 ore dallo sfarfallamento) e dall'attestamento in un plateau senza variazioni significative fino al tempo T1. Tuttavia tra T1 e T2 si osserva una diminuzione significativa, ed i valori restano bassi fino al tempo T3, in corrispondenza del completamento del primo ciclo gonotrofico, quando i processi di ovogenesi e vitellogenesi sono già avanzati. E' ragionevole quindi supporre che tra T0P e T1 le cellule follicolari del follicolo primario e secondario producano ecdisteroidi in quantità sufficiente per indurre lo sviluppo degli ovaroli, particolarmente per quanto riguarda la vitellogenesi.

Tuttavia tra T1 e T2 si osserva una diminuzione significativa del contenuto in ecdisteroidi, poiché il follicolo primario è completamente occupato dall'oocita e le sue cellule follicolari sono degenerate. Quindi solo le cellule follicolari del follicolo secondario e terziario sono ancora attive.

Tra T2 e T3 le cellule follicolari del follicolo primario non sono più attive e il contenuto in ecdisteroidi non differisce significativamente da quello del precedente intervallo di tempo. Nelle femmine trattate il contenuto in ecdisteroidi, misurato tramite EIA, diminuisce in modo significativo tra T0P e T1, dopo il trattamento con diofenolan. Tra T1 e T2 il contenuto in ecdisteroidi aumenta in modo significativo: questo risultato è difficile da spiegare, ma si potrebbe avanzare l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo compensativo, attivo a causa dell'ipertrofia di numerosi follicoli secondari. La diminuzione significativa tra T2 e T3 può essere dovuta al fatto che a questo punto molti follicoli sono in degenerazione.

Nell'adulto gli ormoni giovanili servono principalmente per la produzione di vitellogenine, mediata dagli ecdisteroidi (Nijhout, 1994). La produzione di vitellogenine e quindi la maturazione delle uova nei follicoli procede regolarmente quando è disponibile una quantità sufficiente di ormone giovanile in corrispondenza di una adeguata quantità di ecdisteroidi, prodotta dalle cellule follicolari. Il trattamento con diofenolan, analogo dell'ormone giovanile, potrebbe interferire con questo delicato meccanismo come se si trattasse di una somministrazione in eccesso di ormone giovanile, che potrebbe provocare un profilo anomalo nella produzione di ecdisteroidi e quindi anomalie a carico delle cellule follicolari.

Spesso le alterazioni riscontrabili a livello morfologico e fisiologico sono precedute da alterazioni a livello molecolare, molto meno facilmente rilevabili. I risultati suggeriscono che il trattamento con diofenolan eserciti un effetto inibente sulla produzione di ecdisteroidi al tempo T1, quando sono attivi i follicoli primari e secondari. Al tempo T2 gli ecdisteroidi risalgono leggermente perché vi sono ancora cellule follicolari attive: infatti nel morfotipo 3 il follicolo secondario è di maggiori dimensioni in T2. Le cellule follicolari di questo follicolo potrebbero quindi, in parte, compensare la carenza di ecdisteroidi rilevata nello stadio precedente. Al tempo T3 i follicoli secondari in degenerazione sono molti di più, quindi i pochi follicoli secondari rimasti non sono più in grado di compensare la diminuzione di ecdisteroidi.

Per quanto riguarda le relazioni tra i tre percorsi di trasformazione ovariale e il contenuto in ecdisteroidi, in tutti e tre i percorsi al tempo T1 è presente un alto livello di ecdisteroidi, che si abbassa al tempo T2 a causa delle numerose degenerazioni follicolari e non può essere compensato al tempo T3.

Per quanto riguarda i corpora allata, non sono disponibili in letteratura studi ultrastrutturali nell'adulto di *M. domestica*, ma vi è solo uno studio istologico riguardante le relazioni tra oogenesi e area dei corpora allata (Sakurai, 1977). In altre specie di insetti, come ad esempio nelle femmine delle blatte *Leucophaea maderae* (Scharrer, 1964) e *Diploptera punctata* (Chiang et al., 1991), è noto che il funzionamento dei corpora allata presenta una certa ciclicità, collegata al ciclo ovarico, che alterna fasi di attivazione a fasi di inattività. Le variazioni dei corpora allata, in corrispondenza di queste fasi alterne, sono state attribuite sia a variazioni nel numero di cellule sia a variazioni di volume (Cassier, 1979).

Questo studio riporta per la prima volta dati riguardanti il numero di cellule, il volume e le caratteristiche ultrastrutturali dei corpora allata nelle femmine di *M. domestica*.

Nelle femmine di controllo il volume dei corpora allata aumenta per iperplasia (proliferazione cellulare) da T0 a T0P. Tuttavia il numero delle cellule resta costante da T0 a T3 e il successivo aumento nel volume della ghiandola è dovuto ad ipertrofia, cioè ad un aumento del

volume delle singole cellule e non del loro numero. Le cellule si ipertrofizzano per aumento di attività, con un picco al tempo T2 ed un calo di attività al tempo T3, in accordo con i dati ultrastrutturali che mostrano, a questo stadio, citoplasmi rarefatti e mitocondri a livello corticale in degenerazione, il tutto associato ad inattivazione delle ghiandole, confermando quanto osservato in *L. maderae* (Scharrer, 1964).

In questo studio nei corpora allata al tempo T1 e T2 è stata osservata sia al microscopio ottico sia al microscopio elettronico la presenza di cellule chiare e scure, mai precedentemente documentate in *M. domestica*. La comparsa di queste cellule potrebbe essere collegata all'intensa attività della ghiandola in questi intervalli di tempo.

Nelle femmine trattate il numero di cellule nei corpora allata diminuisce da T0P a T1, cioè immediatamente dopo il trattamento. Il numero di cellule rimane basso da T1 a T3, quindi non è possibile che la ghiandola recuperi la sua attività. Analizzando le variazioni di volume si osserva un ridotto picco in corrispondenza del tempo T2: questo picco rappresenta probabilmente un tentativo della ghiandola di recuperare l'attività, sfruttando segnali precedenti al trattamento con l'insetticida, non dipendenti dall'ormone giovanile. Tuttavia questo tentativo non ha successo e la ghiandola rimane inattiva fino al tempo T3, in cui presenta chiari segni di degenerazione, come osservato in *Lucilia cuprina* (Meurant et al., 1994).

A livello ultrastrutturale le cellule dei corpora allata delle femmine trattate mostrano alterazioni del nucleo, del citoplasma e dei mitocondri tali da suggerire che la ghiandola passi direttamente dallo stadio di inattivazione a quello di degenerazione.

Quindi gli effetti del diofenolan non sarebbero limitati agli ovari e agli ovaroli, ma si estenderebbero anche ai corpora allata, interferendo con i loro cicli fisiologici di attivazione e inattivazione. L'insetticida potrebbe quindi "colpire" la capacità riproduttiva dell'adulto, modificando la fase critica della maturazione del follicolo, influenzando la deposizione delle uova e la loro schiusa.

E' quindi possibile avanzare l'ipotesi che il trattamento con diofenolan corrisponda ad un eccesso di ormone giovanile e che questo eccesso inibisca la fase di attivazione dei corpora allata tramite un meccanismo a feedback che segnala che non vi è più necessità di ormone giovanile. In queste condizioni la ghiandola passerebbe direttamente dalla fase di inattivazione a quella di degenerazione.

Come altri insetticidi regolatori della crescita, il diofenolan è conosciuto come insetticida di terza generazione che colpisce gli stadi immaturi. In Italia non è registrato per *M. domestica*. I risultati di questo studio mostrano che questo principio attivo è efficace come inibitore dello sfarfallamento contro questo infestante di notevole rilevanza medico-sanitaria. Per avere

ulteriori conferme di questo risultato sarebbe interessante indagare, in futuro, gli effetti diretti del principio attivo sui primi due stadi larvali e sulle pupe.

Oltre ad una attività biocida in *M. domestica* il diofenolan esercita chiaramente una fondamentale attività sterilizzante, interferendo a vari livelli con l'attività riproduttiva delle femmine, causando anomalie nell'apparato riproduttore (particolarmente a livello degli ovarioli) e nei corpora allata.

Ulteriori indagini in questo campo potrebbero riguardare gli effetti sterilizzanti sui maschi, l'estensione della mappatura degli ovari ad un numero maggiore di femmine e l'analisi ultrastrutturale dei corpora allata in corrispondenza del secondo e terzo ciclo gonotrofico. Gli effetti biocidi e sterilizzanti del diofenolan su *M. domestica* sono di grande interesse nell'ambito dei programmi di lotta integrata ("Integrated Pest Management") per la loro attività a vari livelli del ciclo biologico. Poiché è noto che *M. domestica*, come altri insetti nocivi, ha una forte tendenza a sviluppare resistenza agli insetticidi tradizionalmente impiegati come adulticidi (fosfororganici, piretroidi e carbammati) (Scott et al. 2000, Kaufman et al. 2001, Marçon et al. 2003, Khan et al. 2013) è necessario disporre di insetticidi che agiscano simultaneamente a differenti livelli del ciclo biologico, e che siano sicuri per l'ambiente, le specie utili e la salute umana (Yu, 2008).

Il fatto che per il diofenolan sia stata riscontrata, in questa tesi un'attività multipla: di abbattere la popolazione di mosche tramite azione sugli stadi immaturi e di sterilizzazione delle femmine con conseguente crollo della popolazione nelle generazioni successive, ne fa un insetticida potenzialmente utile nella lotta contro questo insetto nocivo e sfruttabile per diminuire l'uso degli adulticidi, che richiedono interventi ripetuti e su larga scala. Per tutte queste ragioni è opportuno estendere le ricerche sul diofenolan sviluppando adatte prove in campo.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E SITOGRAFICI

- Abahussain M. 2006. Effect of the Non-steroidal Ecdysone Agonist, RH-5849, as a Control Agent Against the False Stable Fly, *Muscina stabulans* (Falle'n). Pak. J. Biol. Sci. 9: 530-533.
- Abbott W.S. 1925. A mehods of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Achiano K.A., Giliomee J.H. 2005. Biology of the house fly predator *Carcinops pumilio* (Erichson) (Coleoptera: Histeridae). Biocontrol 50: 899-910.
- Adams T.S. 1974. The role of juvenile hormone in housefly ovarian follicle morphogenesis. J. Insect Physiol. 20: 263-276.
- Adams T.S. 1981. Activation of successive ovarian gonotrophic cycles by the corpus allatum in the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Int. J. Inver. Repr. Dev. 3: 41-48.
- Adams T.S., Filipi P.A. 1988. Interaction between juvenile hormone, 20hydroxyecdysone, the corpus cardiacum-allatum complex, and the ovaries in regulating vitellogenin levels in the house fly, *Musca domestica*. J. Insect Physiol. 34: 11-19.
- Adams T.S., Hagedorn H.H., Wheelock G.D. 1985. Haemolymph ecdysteroid in the housefly, *Musca domestica*, during oögenesis and its relationship with vitellogenin levels. J. Insect Physiol. 31: 91-97.
- Adams T.S., Holt G.G. 1987. Effect of pheromone components when applied to different models on male sexual behavior in the housefly, *Musca domestica*. J. Insect Physiol. 33: 13-16.
- Adams T.S., Li Q.J. 1998. Ecdysteroidostatin from the house fly, *Musca domestica*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 38: 166-176.
- Adham F.K., Mehlhorn H., El-Basheir Z.M., Yamany A.S. 2009. Light and electron microscopic studies on the development of the ovaries of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 105: 939-948.
- Agui N.; Izumi S.; Tomino S. 1985. The role of ecdysteroids and juvenoids in vitellogenin levels and follicle development in the housefly, *Musca domestica*. Appl. Ent. Zool. 20: 179-188.
- Alam M.J., Motoyama N. 2000. Effect of cyromazine fed to adults on reproduction and offspring development in housefly. J. Pestic. Sci. 25: 228-233.

- Alahmed A.M. 1998. Seasonal distribution and characterization of breeding sites of house fly *Musca domestica* (L.) and stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) in dairy farm in the central region of Saudi Arabia. Emir. J. Agric. Sci. 10: 16-23.
- Amer M.S., Ghoneim K.S., Abdel-Ghaffar A.A., Al-Dali A.G., Bream A.S., Hamadah Kh.Sh. 2006. Reproductive potentiality of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) as affected by two chitin synthesis inhibitors: Lufenuron and Diofenolan. Al-Azhar Bull. Sci. 17: 67-75.
- Ansari M.S., Murad H. 1981. Histomorphology of the female reproductive organ of the cattle fly *Hippobosca maculata* Lch (Diptera: Hippoboscidae). Neth. J. Zool. 31: 466-471.
- Aribi N., Smagghe G., Lakbar S., Soltani-Mazouni N., Soltani N. 2006. Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. Pest. Biochem. Physiol. 4: 55-62.
- Arong G.A., Imandeh G.N., Utsu A.A. 2011. The influence of food type on larval growth in *Musca domestica* and *Lucilia sericata* (Diptera) in Calabar, Nigeria. World Journal of Science and Technology (WJST) 1: 73-77.
- Avancini R.M., Mello M.L. 1990. Endopolyploidy in follicle epithelial cells around the nurse chamber during oogenesis in *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). Genetica 81: 5-10.
- Avancini R.M.P., Do Prado A.P. 1986. Oogenesis in *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Int. J. Insect Morphol. 15: 375-384.
- Awad T.I., Mulla MS. 1984. Morphogenetic and histopathological effects induced by the insect growth regulator cyromazine in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol. 21: 419-426.
- Axtell R.C. 1986. Fly management in poultry production: cultural, biological, and chemical. Poultry Sci. 65: 657-667.
- Bakr R.F., Ghoneim K.S., Al-Dali A.G., Tanani M.A., Bream A.S. 2008. Efficiency of the chitin synthesis inhibitor lufenuron (cga-184699) on growth, development and morphogenesis of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. 1: 41-57.
- Baltaev U.A., Shangaraeva G.S. 2000. Zooecdysteroids: distribution and role in arthropod life cycles. Chem. Nat. Compd. 36: 543-559.
- Basso A.L., Forneris N.S., Filiberi A., Argaraña C.E., Rabossi A., Quesada-Allué L.A. 2011. Metamorphosis and gonad maturation in the horn fly *Haematobia irritans*. J. Insect Sci. 11: 174-184.

- Bergot B.J., Jamieson G.C., Ratcliff M.A., Schooley D.A. 1980. JH Zero: new naturally occurring insect juvenile hormone from developing embryos of the tobacco hornworm. *Science* 210: 336-338.
- Bergot B.J., Schooley D.A., de Kort C.A.D. 1981a. Identification of JH III as the principal juvenile hormone in *Locusta migratoria*. *Experientia* 37: 909-910.
- Bergot, B.J., Baker F.C., Cerf D.C., Jamieson G., Schooley D.A. 1981b. Qualitative and quantitative aspects of juvenile hormone titers in developing embryos of several insect species: discovery of a new JH-like substance extracted from eggs of *Manduca sexta*. In: G.E. Pratt, G.T. Brooks (editori), *Juvenile hormone biochemistry*, Elsevier/North Holland Press, Amsterdam, Olanda pp. 33-45.
- Bernard D.R., Geden C.J. 1993. Influence of larval density and temperature in poultry manure on development of the house fly (Diptera: Muscidae) *Environm. Entomol.* 22: 971-977.
- Bernardini Mosconi P., Cella-Malugani L. 1960. La ghiandola protoracica in alcune specie di blatte. *Symp. Gen. Biol. It.* 7: 44-58.
- Besse F., Pret A.M. 2003. Apoptosis-mediated cell death within the ovarian polar cell lineage of *Drosophila melanogaster*. *Development* 130: 1017-1027.
- Bier K. (1963): Synthese, interzellulärer transport, und abbau von ribonukleinsäure im ovar der stubenfliege *Musca domestica*. (in tedesco) *J. Cell Biol.* 16: 436-440.
- Birkemoe T., Sverdrup-Thygeson A. 2011. Stable fly (*Stomoxys calcitrans*) and house fly (*Musca domestica*) densities: a comparison of three monitoring methods on pig farms. *J. Pest Sci.* 84: 273-280.
- Blomquist G.J., Dillwith J.W., Pomonis J.G. 1984. Sex pheromone of the housefly: Metabolism of (Z)-9-tricosene to (Z)-9,10-epoxytricosane and (Z)-14-tricosen-10-one. *Insect Biochem.* 14: 279-284.
- Bodin A., Jaloux B., Mandon N., Vannier F., Delbecq J.P., Monge J.P., Mondy N. 2007. Host-induced ecdysteroids in the stop-and-go oogenesis in a synovigenic parasitoid wasp. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65: 103-111.
- Borovsky D. 1985. Isolation and characterization of highly purified mosquito oostatic hormone. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2: 333-349.
- Brown E.H., King R.C. 1964. Studies on the events resulting in the formation of an egg chamber in *Drosophila melanogaster*. *Growth* 28: 41-81.

- Brown M.R., Sieglaff D.H., Rees H.H. 2009. Gonadal ecdysteroidogenesis in Arthropoda: occurrence and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 105-125.
- Brüning E., Saxer A., Lanzrein B. 1985. Methyl farnesoate and juvenile hormone III in normal and precocene treated embryos of the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Int. J. Inv. Rep. Dev.* 8: 193-196.
- Büning J. 1994. The insect ovary: ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. Chapman and Hall, Londra, Regno Unito.
- Burgess I., Davies E.A. 1991. Cutaneous myiasis caused by the housefly, *Musca domestica*. *Brit. J. Dermatol.* 125: 377-379.
- Cafarchia C., Lia R.P., Romito D., Otranto D. 2009. Competence of the housefly, *Musca domestica*, as a vector of *Microsporium canis* under experimental conditions. *Med. Vet. Entomol.* 23: 21-25.
- Calzolari M., Leotti G., Bianchi M., Sarli G., Dottori M. 2008. Pseudo-myiasis caused by *Ophyra anescens* (Diptera: Muscidae) in swines. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*. Edizioni SIPAS, Parma, Italia.
- Cardoen J., Schoofs L., Broekaert D., Van Mellaert H., Verachtert B., De Loof A. 1986. Polyploidization and localization of poly(A)⁺ RNA in the different cell types of the vitellogenic meroistic ovary of the fleshfly, *Sarcophaga bullata*. *Histochemistry* 85: 305-312.
- Cassier P. 1979. The corpora allata of insects. *Int. Rev. Cytol.* 57: 1-73.
- Cavaliere V., Taddei C., Gargiulo G. 1998. Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* 208: 106-112.
- Chaiwong T., Sukontason K., Chaisri U., Kuntalue B., Vogtsberger R.C., Sukontason K.L. 2012. Ovarian ultrastructure and development of the blow fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Int. J. Parasitol. Res.* 4: 65-70.
- Chaudhry C., Bindra S., Sharma V., Chhabra N., Chhabra S. 2011. Oral myiasis. *Indian Journal of Dental Advancements (IJDA)* 3: 471-474.
- Chia W. K., Morrison P.E. 1972. Autoradiographic and ultrastructural studies on the origin of yolk protein in the housefly, *Musca domestica* L. *Can. J. Zool.* 12: 1569-1576.
- Chiang A.-S., Burns E.L., Schal C. 1991. Ovarian regulation of cyclic changes in size and activity of corpus allatum cells in *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.* 37: 907-917.

- Cladel A., Doiz O., Morales S., Varea M., Seral C., Castillo J., Fleta J.C., Lus R. 2002. Housefly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol.* 49: 163-164.
- Clift A.D., McDonald F.J.D. 1973. Morphology of the internal reproductive system of *Lucilia cuprina* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae) and a method of determining the age of both sexes. *Int. J. Insect Morphol.* 2: 327-333.
- Coons L.B., Axtell R.C. 1973. Sensory of the first tarsi and palps of the mite *Macrocheles muscaedomesticae*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 66: 539-544.
- Crosskey R.W. 1993. Introduction to Diptera. In: Lane, R.P., Crosskey R.W. (editori) *Medical insects and arachnids*. British Museum (Natural History), Chapman and Hall, Londra, Regno Unito.
- Cummings M.R., King R.C. 1970. Ultrastructural changes in nurse and follicles cells during late stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Z. Zellforsch* 110: 1-8.
- Cummings M.R., O'Halloran T.J. 1974. Polar aeropyles in the egg of the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *T. Am. Microsc. Soc.* 93: 277-280.
- Cusson M., Delisle J., Miller D. 1999. Juvenile hormone titers in virgin and mated *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana* females: assessment of the capacity of males to produce and transfer JH to the female during copulation. *J. Insect Physiol.* 45: 637-646.
- De Cuevas M., Spradling A.C. 1998. Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* 125: 2781-2789.
- De Jesùs A.J., Olsen A.R., Bryce J.R., Whiting R.C. 2004. Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Int. J. Food Microbiol.* 93: 259-262.
- De Loof A., Geysen J., Cardoen J., Verachtert B. 1990. Comparative developmental physiology and molecular cytology of the polytropic ovarian follicles of the blowfly *Sarcophaga bullata* and the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 96: 309-321.
- Dej K.J., Spradling A.C. 1999. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. *Development* 126: 293-303.
- Delbecque J.P., Weidner K., Hoffmann K.H. 1990. Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invert. Reprod. Develop.* 18: 29-42.

- Deng W., Lin H. 1997. Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 189: 79-94.
- Dhadialla T.S., Retnakaran A., Smagghe G. 2005. Insect growth- and development-disrupting insecticides. In: Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S., editori. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, UK, pp 55-116.
- Di Domenico D., Ruggeri L., Pampiglione G. 2005. Primo caso italiano di resistenza al larvicida ciromazina da parte di *Musca domestica* 4: 34-37.
- Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D., Varricchio P., Caprio E., Nazzi F., Gargiulo G., Pennacchio F. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110: 18466-18471.
- Dillwith J.W., Adams T.S., Blomquist G.J. 1983. Correlation of housefly sex pheromone production with ovarian development. *J. Insect Physiol.* 29: 377-386.
- Dillwith J.W., Blomquist G.J. 1982. Site of sex pheromone biosynthesis in the female housefly, *Musca domestica* L. *Experientia* 38: 471-473.
- Dogra S.S., Mahajan V.K. 2010. Oral myiasis caused by *Musca domestica* larvae in a child. *Int. J. Pediatr. Otorhynolaryngol.* 5: 105-107.
- Doiz O., Clavel A., Morales S., Varea M., Castillo F.J., Rubio C., Gomez-Lus R. 2000. House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Giardia lamblia*, *Folia Parasitol. (Praha)* 47: 330-331.
- Fallatah S., Salah N., Radi M. 2007. Impact of solid wastes of urban and rural Egyptian districts on fly density and associated bacteria. *Global Journal of Molecular Sciences (GJMS)* 2: 21-28.
- Farkas R., Jantnyik T. 1990. Laboratory studies on *Hydrotaea aenescens* as predator of house fly larvae (Diptera: Muscidae). *Parasit. Hung.* 23: 103-108.
- Feldlaufer M., Herbert E.W., Svoboda J.A., Thompson M.J., Lusby W.R. 1985. Makisterone A - The major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 15: 597-600.
- Ferraz A.C.P., Proença B., Gadelha B.Q., Faria L.M., Barbalho M.G.M., Aguiar-Coelho V.M., Lessa C.S.S. 2010. First record of human myiasis caused by association of the species

Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae), *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae), and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol. 47: 487-490.

Fletcher M.G., Axtell R.C., Stinner R.E. 1990. Longevity and fecundity of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) as a function of temperature. J. Med. Entomol. 27: 922-926.

Förster M., Klimpel S., Mehlhorn K., Sievert K., Messler S., Pfeffer K. 2007. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. Parasitol. Res. 101: 243-246.

Förster M., Klimpel S., Sievert K. 2009a. The house fly (*Musca domestica*) as a potential vector of metazoan parasites caught in a pig-pen in Germany. Vet. Parasitol. 160: 163-167.

Förster M., Sievert K., Messler S., Klimpel S., Pfeffer K. 2009b. Comprehensive study on the occurrence and distribution of pathogenic microorganisms carried by synanthropic flies caught at different rural locations in Germany. J. Med. Entomol. 46: 1164-1166.

Fotedar R. 2001. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholera* in India. Acta Trop. 78: 31-34.

French A., Hoopingarner R. 1965. Gametogenesis in the house fly, *Musca domestica*. Ann. Entomol. Soc. Am. 58: 650-657.

Fuchs M.S., Craig G.B. Jr, Despommier D.D. 1969. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 15: 701-709.

Gäde G., Hoffmann K.H., Spring J.H. 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. Physiol. Rev. 77: 963-1032.

Gerry A.C., Higginbotham G.E., Periera L.N., Lam A., Shelton C.R. 2011. Evaluation of surveillance methods for monitoring house fly abundance and activity on large commercial dairy operations. J. Econom. Entomol. 104: 1087-1092.

Ghoneim, K.S., Amer M.S., Bream A.S., Al-Dali A.G., Hamadah K.S. 2004. Developmental and morphogenic responses of the house fly *Musca domestica* to the CSIs: Lufenuron and Diofenolan. Al-Azhar Bull. Sci. 15: 25-42.

Ghoneim K.S., Amer M.S., Bream A.G., Hamadah K.S. 2007a. Effectiveness of margosan-O and jojoba on some reproductive aspects of the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). J. Agricult. Biol. 9: 338-341.

- Ghoneim K. S., Bream A. S., Tanani M. A., Nassar M. I. 2007b. Efficacy of Lufenuron (CGA-184699) and Diofenolan (CGA-59205) on survival, growth and development of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). 59th International Symposium on Crop Protection Ghent, Belgio. 246-279
- Giangaspero A. 1997. Le mosche di interesse veterinario. I Muscidae. Guida alla conoscenza ed al riconoscimento. Edizioni Agricole Calderini s.r.l., Bologna, Italia.
- Giangaspero A. 2003. Mosche e mosconi in ambiente urbano. In: Puccini V., Tarsitano E. Parassitologia urbana. Città, animali e salute pubblica. Edagricole, Bologna, Italia.
- Gilbert L.I., Granger N.A., Roe R.M. 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 617-644.
- Gilbert S.F. 2013. *Developmental Biology*. 10th edition. Palgrave Macmillan Editor, Basingstoke, Regno Unito.
- Gillott C. 2005. *Entomology*. Springer Editions, Dordrecht, Olanda.
- Giorgi F. 1978. Intercellular bridges in ovarian follicle cells of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 186: 413-422.
- Giorgi F., Yin C.-M., Stoffolano J.G. 1990. Structural aspects of ovarian sheaths in *Phormia regina* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *B. Zool.* 57: 11-19.
- Goodman T., Morrison P.E., Davies D.M. 1968. Cytological changes in the developing ovary of the house fly fed milk and other diets. *Can. J. Zool.* 46: 409-421.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., Fayer R., Bixler H. 1999. House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 500-504.
- Graczyk T.K., Knight R., Gilman R.H., Cranfield M.R. 2001. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect.* 3: 231-235.
- Graczyk T.K., Knight R., Tarnang L. 2005. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 128-132.
- Grandi G. 1966. *Istituzioni di entomologia generale*. Edizioni Calderini, Bologna, Italia.
- Greene G.L. 1996. Rearing techniques for *Creophilus maxillosus* (Coleoptera: Staphylinidae), a predator of fly larvae in cattle feedlots. *J. Econ. Entomol.* 89: 848-851.

- Greene G.L., Guo Y, Chen H. 1998. Parasitization of house fly pupae (Diptera: Muscidae) by *Spalangia nigroaenea* (Hymenoptera: Pteromalidae) in cattle feedlot environments. Biol. Control 12: 7-13.
- Grieder N.C., de Cuevas M., Spradling A.C. 2000. The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in *Drosophila*. Development 127: 4253-4264.
- Grübel P., Hoffman J.S., Chong F. K., Burstein N.A., Mepani C., Cave D.R. 1997. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 35: 1300-1303.
- Hagedorn H.H., O'Connor J.D., Fuchs M.S., Sage B., Schlaeger D.A., Bohm M.K. 1975. The ovary as a source of alpha-ecdysone in an adult mosquito. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 3255-3259.
- Hall T.J., Sanders S.M., Cummings M.R. 1976. A biochemical study of oogenesis in the housefly, *Musca domestica*. Insect Biochem. 6: 13-18.
- Hammond M.P., Laird C.D. 1985. Chromosome structure and DNA replication in nurse and follicle cells of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 91: 267-278.
- Hinton H.E. 1960. The chorionic plastron and its role in the eggs of the Muscinae (Diptera). Q. J. Microsc. Sci. 101: 313-332.
- Hinton H.E. 1963. The respiratory system of the egg-shell of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* Meig., as seen with the electron microscope. J. Insect Physiol. 9: 121-129.
- Hinton H.E. 1967. The respiratory system of the egg-shell of the common housefly. J. Insect Physiol. 13: 647-651.
- Hinton H.E. 1969. Respiratory systems of insect egg shells. Annu. Rev. Entomol. 14: 343-368.
- Hintze-Podufal C. 1970. The innervation of the prothoracic glands of *Cerura vinula* L. (Lepidoptera). Experientia 26: 1269-1271.
- Hiss E.A., Fuchs M.S. 1972. The effect of matrone on oviposition in the mosquito, *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 18: 2217-2227.
- Hoffmann K.H., Weidner K., Seidel M. 1992. Sites of ecdysteroid biosynthesis in female adults of *Gryllus bimaculatus* (Ensifera, Gryllidae). J. Comp. Physiol. B 162: 731-739.

- Hoffmann K.H., Meyering-Vos M., Lorenz M.W. 1999. Allatostatins and allatotropins: is the regulation of corpora allata activity their primary function? *Eur. J. Entomol.* 96: 255-266.
- Hogsette J.A. 1996. Development of house flies (Diptera: Muscidae) in sand containing varying amounts of manure solids and moisture. *J. Econ. Entomol.* 89: 940-945.
- Holt P.S., Geden C.J., Moore R.W., Gast R.K. 2007. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6030-6035.
- Howard J. 2001. Nuisance flies around a landfill: patterns of abundance and distribution. *Waste Manage. Res.* 19: 308-313.
- Howard J., Wall R. 1996. Autosterilization of the house fly, *Musca domestica*, using the chitin synthesis inhibitor triflumuron on sugar-baited targets. *Med. Veter. Entomol.* 10: 97-100.
- Imai C. 1984. Population dynamics of houseflies, *Musca domestica*, on experimentally accumulated refuse. *Res. Popul. Ecol.* 26: 353-362.
- Introna F., Campobasso C.P. 1998. *Entomologia forense. Il ruolo dei ditteri nelle indagini medico-legali.* Edizioni Essebiemme, Noceto (Parma), Italia.
- Jaglarz M.K., Krzeminski W., Biliński S.M. 2008. Structure of the ovaries and follicular epithelium morphogenesis in *Drosophila* and its kin. *Dev. Genes Evol.* 218: 399-411.
- Jiang Y., Lei C., Niu C., Fang Y., Xiao C., Zhang Z. 2002. Semiochemicals from ovaries of gravid females attract ovipositing female houseflies, *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* 48: 945-950.
- Jones G., Hanzlik T., Hammock B.D., Schooley D.A., Miller C.A., Tsai L.W., Baker F.C. 1990. The juvenile hormone titre during the penultimate and ultimate larval stadia of *Trichoplusia ni*. *J. Insect Physiol.* 36: 77-83.
- Judy K.J., Schooley D.A., Hall M.S., Bergot B.J., Siddall J.B. 1973. Chemical structure and absolute configuration of a juvenile hormone from grasshopper corpora allata in vitro. *Life Sci.* 13: 1511-1516.
- Judy K.J., Schooley D.A., Troetschler R.C., Jennings R.C., Bergot J.B., Hall M.S. 1975. Juvenile hormone production by corpora allata of *Tenebrio molitor* in vitro. *Life Sci.* 16:1059-66.

- Kaufman P.E., Scott J.G., Rutz D.A. 2001. Monitoring insecticide resistance in house flies (Diptera: Muscidae) from New York dairies. *Pest Manag. Sci.* 57: 514-521.
- Kawada H., Senbo S., Abe Y. 1992. Effects of pyriproxyfen on the reproduction of the housefly, *Musca domestica*, and the German cockroach, *Blattella germanica*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 43: 169-175.
- Khan H.A., Akram W., Shad S.A., Lee J.J. 2013. Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica* L. *PLoS One* 8: e60929. doi:10.1371/journal.pone.0060929.
- King R.C. 1970. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, USA.
- King R.C., Aggarwal S.K., Bodenstein D. 1966. The comparative submicroscopic cytology of the corpus allatum-corpora cardiaca complex of wild type and *fes* adult female *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 161: 151-175.
- King R.C., Robinson A.C., Smith R.F. 1956. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. *Growth* 20: 121-157.
- Kirilly D., Xie T. 2007. The *Drosophila* ovary: an active stem cell community. *Cell Res.* 17: 15-25.
- Kleine-Schonnefeld H., Engels W. 1981. Symmetrical pattern of follicle arrangement in the ovary of *Musca domestica*. *Zoomorphology* 98: 185-190.
- Köllisch G.V., Lorenz M.W., Kellner R., Verhaert P.D., Hoffmann K.H. 2000. Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5502-5508.
- Koolman J. 1990. Ecdysteroids. *Zool. Sci.* 7: 563-580.
- Kristiansen K., Skovmand O. 1985. A method for the study of population size and survival rate of houseflies. *Entomol. Exp. Appl.* 38: 145-150.
- Kubrakiewicz J., Biliński S.M., Mazurkiewicz M. 1998. Diptera - Ovary structure and oogenesis in midges and flies. *Folia Histochem. Cytobiol.* 36: 197-203.
- Kubrakiewicz J., Jabłońska A., Mazurkiewicz M., Biliński S.M. 2003. Differentiation and diversification of the follicular cells in flies: insight from the studies of the lower brachycerans' ovaries. *Genesis* 36: 214-224.

- LaChance L.E., Bruns S.B. 1963. Oogenesis and radiosensitivity in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Biol. Bull. 124: 65-83.
- Lafont R., Koolman J. 2009. Diversity of ecdysteroids in animal species. In: G. Smagghe (editore), Ecdysone: structures and functions. Springer Science, Berlino, Germania, pp. 47-71.
- Lafont R., Dauphin-Villemant C., Warren J.T., Rees H. 2012. Ecdysteroid chemistry and Biochemistry. In: Gilbert L.I. (editore), Insect Endocrinology. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 106-176.
- Learmount J., Chapman P., Macnicoll A. 2002. Impact of an insecticide resistance strategy for house fly (Diptera: Muscidae) control in intensive animal units in the United Kingdom. J. Econ. Entomol. 95: 1245-50.
- LeOraSoftware. 1987. POLO-PC Probit and Logit Analysis. User's manual, Berkeley, California, USA.
- Levine O.S., Levine M.M. 1991. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. Rev. Infect. Dis. 13: 688-696.
- Li Q.J., Gong H. 1995. Oostatic hormone regulated cyclical egg maturation in the housefly *Musca domestica vicina*. Acta Entomol. Sinica 38: 393-401.
- Li X. 2007. Juvenile hormone and methyl farnesoate production in cockroach embryos in relation to dorsal closure and the reproductive modes of different species of cockroaches. Arch. Insect Biochem. Physiol. 66: 159-168.
- Lilly M.A., Spradling A.C. 1996. The *Drosophila* endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. Genes Dev. 10: 2514-2526.
- Lin H., Yue L., Spradling A.C. 1994. The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. Development 120: 947-956.
- Lineva V.A. 1953. Physiological age of the female of the common fly *M. domestica*. Ent. Obozrenie. 33: 161-173.
- Lysyk T.J. 1991. Effects of temperature, food, and sucrose feeding on longevity of the house fly (Diptera: Muscidae). Environ. Entomol. 20: 1176-1180.
- Lysyk T.J. 1993. Adult resting and larval developmental sites of stable flies and house flies (Diptera: Muscidae) on dairies in Alberta. J. Econ. Entomol. 86: 1746-1753.

- Lysyk T.J., Axtell R.C. 1986a. Estimating numbers and survival of house flies (Diptera: Muscidae) with mark/recapture methods. J. Econ. Entomol. 79: 1016-1022.
- Lysyk T.J., Axtell R.C. 1986b. Movement and distribution of house flies (Diptera: Muscidae) between habitats in two livestock farms. J. Econ. Entomol. 79: 993-998.
- Mahowald A.P., Strassheim J.M. 1970. Intercellular migration of centrioles in the germarium of *Drosophila melanogaster*. An electron microscopy study. J. Cell Biol. 45: 306-320.
- Marçon P., Thomas G., Siegfried B., Campbell J., Skoda S. 2003. Resistance status of house flies (Diptera: Muscidae) from southeastern Nebraska beef cattle feedlots to selected insecticides. J. Econ. Entomol. 96, 1016-1020.
- Mazzini M., Giorgi F., Yin C.M., Stoffolano J.G. 1986. The influence of diet on the ultrastructure of ovarian development in *Phormia regina* (Meigen). Redia 69: 605-623.
- Medveczky I., Kovács L., Kovács. F., Papp L. 1988. The role of the housefly, *Musca domestica*, in the spread of Aujeszky's disease (pseudorabies). Med. Vet. Entomol. 2: 81-86.
- Menezes L.C.C.R., Rossi M.N., Godoy W.A.C. 2006. The effect of refuge on *Dermestes ater* (Coleoptera: Dermestidae) predation on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): refuge for prey or the predator? J. Insect Behav. 19: 717-720.
- Meola S.M., Pendleton M.W., Langley P.A., Lovering S.L. 1999. Ultrastructural localization of unique neurosecretory granules in the corpora cardiaca of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, and the tsetse fly, *Glossina morsitans*. J. Morphol. 240: 155-168.
- Meurant K., Sernia C., Rembold H. 1994. The effects of azadirachtin A on the morphology of the ring complex of *Lucilia cuprina* (Wied) larvae (Diptera: Insecta). Cell Tissue Res. 275: 247-254.
- Meyer A.S., Hanzmann E., Murphy R.C. 1971. Absolute configuration of *Cecropia* juvenile hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2312-2315.
- Mian L.S., Maag H., Tacal J.V. 2002. Isolation of Salmonella from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. J. Vector Ecol. 27: 82-85.
- Montell D.J. 2003. Border-cell migration: the race is on. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 13-24.
- Montooth K.L., Gibbs A.G. 2003. Cuticular pheromones and water balance in the house fly, *Musca domestica*. Comp. Biochem. Physiol. A 135: 457-465.

- Moon R.D. 2009. Muscid flies (Muscidae). In: G.R. Mullen e L.A. Durden (editori), Medical and veterinary entomology. Academic Press, Elsevier, Burlington, Massachusetts, USA.
- Murvosh C.M., Thaggard C.W. 1966. Ecological studies of the house fly. Ann. Entomol. Soc. Am. 59: 533-547.
- Nauen R. 2006. Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. Pest Manag. Sci. 62: 690-692.
- Nayduch D., Honko A., Noblet G.P., Stutzenberger F. 2001. Detection of *Aeromonas caviae* in the common housefly *Musca domestica* by culture and polymerase chain reaction. Epidemiol. Infect. 127: 561-566.
- Nazni W.A., Seleena B., Lee H.L., Jeffery J., Rogayah T.A., Sofian M.A. 2005. Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica* (L.). Trop. Biomed. 22: 225-231.
- Nijhout H.F. 1994. Insect hormones. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Nolan III M.P., Kissam J.B. 1985. *Ophyra aenescens*, a potential bio-control alternative for house fly control in poultry house. J. Agric. Entomol. 2: 192-195.
- Noorman N. 2001. Pheromones of the housefly. A chemical and behavioural study. Doctoral Thesis, Rijksuniversiteit Groningen, Van Denderen Editors, Groningen, Olanda, pp. 7-21.
- Nwangwu U.C., Onyido A.E., Egbuche C.M., Iwueze M.O., Ezugbo-Nwobi I.K. 2013. Parasites associated with wild-caught houseflies in *Awka metropolis*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Science (IOSR-JPBS) 6: 12-19.
- Ogienko A.A., Fedorova S.A., Baricheva E.M. 2007. Basic aspects of ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Russ. J. Genet. 43: 1120-1134.
- Okore Oghale O., Amaechi Ebube C., Obike Oluchi U. 2013. Parasitic load on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from different synanthropic environments in Umuahia metropolis. J. Publ. Health Epidemiol. JPHE 5: 309-312.
- Otranto D., Tarsitano E., Traversa D., De Luca F., Giangaspero A. 2003. Molecular epidemiological survey on the vectors of *Thelazia gulosa*, *Thelazia rhodesi* and *Thelazia skrjabini* (Spirurida: Thelaziidae). Parasitology 127: 365-373.

- Pagani M., Savoldelli S., Schiaparelli A. 2010. Manuale pratico per il monitoraggio e riconoscimento degli insetti infestanti le industrie alimentari. Vol. 2: Diptera, Coleoptera, Hymenoptera. Cenni sugli acari delle derrate. Edizioni Sinergitech, Forlì, Italia.
- Pampiglione G., Romi R. 2012. Mosca domestica e altre specie sinantropiche. In: Artropodi di interesse sanitario in Italia e in Europa. Romi R, Khoury C, Bianchi R, Severini F (Ed.). Rapporti ISTISAN 12/41, Edizioni Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia.
- Pedigo L.P. 2002. Entomology and pests management (4 edizione). Prentice Hall Inc., Londra, UK.
- Pezzi M., Lanfredi M., Chicca M., Tedeschi P., Brandolini V., Leis M. 2011. Preliminary evaluation of insecticide resistance in a strain of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from an intensive chicken farm of Northern Italy. J. Environ. Sci. Health. 46: 480-485.
- Porcheron P., Moriniere M., Grassi J., Pradelles P. 1989. Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. Insect. Biochem. 2: 117-122.
- Richard D.S., Applebaum S.W., Sliter T.J., Baker F.C., Schooley D.A., Reuter C.C., Henrich V.C., Gilbert L.I. 1989. Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis *in vitro* by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher Diptera. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 1421-1425.
- Riddiford L.M. 1996. Molecular aspect of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In: L.I. Gilbert, J.R. Tata, B.G. Atkinson (editori), Metamorphosis: post-embryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 223-251.
- Riemann J.G., Moen D.J., Thorson B.J. 1967. Female monogamy and its control in houseflies. J. Insect Physiol. 13: 407-418.
- Riemann J. G., Thorson B.J. 1969. Effect of male accessory material on oviposition and mating by female houseflies. Ann. Entomol. Soc. Am. 62: 828-834.
- Riparbelli M.G., Callaini G. 1996. Meiotic spindle organization in fertilized *Drosophila* oocyte: presence of centrosomal components in the meiotic apparatus. J. Cell Sci. 109: 911-918.
- Robinson D.N., Cant K., Cooley L. 1994. Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. Development 120: 2015-2025.

- Robinson W.H. 2005. Urban insects and arachnids: a handbook of urban entomology. Cambridge University Press, Cambridge, Regno Unito.
- Rogoff W.M., Beltz A.D., Johnsen J.O., Plapp F.W. 1964. A sex pheromone in the housefly, *Musca domestica* L. J. Insect Physiol. 10: 239-246.
- Roth S., Lynch J.A. 2009. Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. Cold Spring Harb. Perspect Biol 1: a001891 (online).
- Rozendaal J.A. 1997. Vector Control. Methods for use by individuals and communities. World Health Organization (WHO) Press, Ginevra, Svizzera, pp.302-323.
- Rueda L.M., Axtell R.C. 1985a. Comparison of hymenopterous parasites of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), pupae in different livestock and poultry production systems. Environ. Entomol. 14: 217-222.
- Rueda L.M., Axtell R.C. 1985b. Effect of depth of house fly pupae in poultry manure on parasitism by six species of Pteromalidae (Hymenoptera). J. Entomol. Sci. 20: 444-449.
- Sakurai H. 1973. Studies on the ovarian development in the housefly, *Musca domestica vicina* Macquart. I. Stages of oogenesis and the function of the follicle. Jpn J. Med. Sci. Biol. 5: 239-248.
- Sakurai H. 1977. Endocrine control of oogenesis in the housefly, *Musca domestica vicina*. J. Insect Physiol. 23: 1295-1302.
- Scharrer B. 1948. The prothoracic glands of *Leucophaea maderae* (Orthoptera). Biol Bull. 95: 186-198.
- Scharrer B. 1964. Histophysiological studies on the corpus allatum of *Leucophaea maderae*, IV Ultrastructure during normal activity cycle. Z. Zellforsch. 62: 125-148.
- Scheer B.T. 1961. The neuroendocrine system of arthropods. Vitam. Horm. 18: 141-204.
- Schlein Y., Galun R., Ben-Eliah M.N. 1981. Abstinons, male-produced deterrents of mating flies. J. Chem. Ecol. 7: 285-290.
- Schmidtman E.T. 1991. Suppressing immature house and stable flies in outdoor calf hutches with sand, gravel, and sawdust bedding. J. Dairy Sci. 74: 3956-3960.
- Schooley D.A., Judy K.J., Bergot B.J., Hall S.M., Siddall J.B. 1973. Biosynthesis of the juvenile hormones of *Manduca sexta*: labeling pattern from mevalonate, propionate, and acetate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 2921-2925.

- Schooneveld H., Tesser G.I., Veenstra J.A., Romberg-Prive H.M. 1983. Adipokinetic hormone and AKH-like peptide demonstrated in the corpora cardiaca and nervous system of *Locusta migratoria* by immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.* 230: 67-76.
- Schuster R.K., Sivakumar S., Kinne J., Babiker H., Traversa D., Buzzell G.R. 2010. Cutaneous and pulmonic habronemosis transmitted by *Musca domestica* in a stable in the United Arab Emirates. *Vet. Parasitol.* 174: 170-174.
- Scott J.G., Alefantis T.G., Kaufman P.E., Rutz D.A. 2000. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. *Pest Manag. Sci.* 56: 147-153.
- Sehgal R., Bhatti H.P., Bhasin D.K., Sood A.K., Nada R., Malla N., Singh K. 2002. Intestinal myiasis due to *Musca domestica*: a report of two cases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55: 191-193.
- Shekhawat P.S., Joshi K.R., Shekhawat R. 1993. Contaminated milk powder and intestinal myiasis. *Indian Pediatr.* 30: 1138-1139.
- Shin J.G., Seo M.J., Shin H.J., Youn Y.N. 2003. Mating preferences and theoretical discussion on courtship in the male house fly, *Musca domestica*. *J. Asia-Pac. Entomol.* 6: 21-27.
- Singer T.L. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition system of insects. *Am. Zool.* 38: 394-405.
- Singh S., Kumar K. 2011. Diofenolan: a novel insect growth regulator in common citrus butterfly, *Papilio demoleus*. *Phytoparasitica* 39: 205-213.
- Siriwattananurungsee S., Sukontason K.L., Kuntalue B., Olson S.P.J.K., Sukontason K. 2005. Morphology of the puparia of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and blowfly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Parasitol. Res.* 96: 166-170.
- Siriwattananurungsee S., Sukontason K.L., Kuntalue B., Sukontason K. 2008. Ultrastructural alteration of larvae and puparia of blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) and house fly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) exposed to neem extract. *Trop. Biomed.* 25:107-116.
- Skidmore P. 1985. The biology of the Muscidae of the world. Dr W. Junk Publishers, Boston, Massachusetts, USA.
- Soltani N., Delachambre J., Delbecq J.P. 1989. Stage-specific effects of diflubenzuron on ecdysteroid titers during the development of *Tenebrio molitor*: evidence for a change in hormonal source. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 350-356.

Soltani N., Aribi N., Berghiche H., Lakbar S., Smagghe G. 2002. Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in *Tenebrio molitor* pupae in vivo and in vitro. Pest. Biochem. Physiol. 72: 83-90.

Stay B., Zhang J.R., Tobe S.S. 2002. Methyl farnesoate and juvenile hormone production in embryos of *Diptera punctata* in relation to innervation of corpora allata and their sensitivity to allatostatin. Peptides 23: 1981-1990.

Stenersen J. 2004. Chemical pesticides: mode of action and toxicology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Stoch F. 2003. Checklist of the species of the Italian fauna [online]. Disponibile da: <http://www.faunaitalia.it/checklist/invertebrates/families/Muscidae.html> [consultato il 28 novembre 2013].

Streibert H.P., Frischknecht M.L., Karrer F. 1994. Diofenolan - a new insect growth regulator for the control of scale insects and important lepidopterous pests in deciduous fruit and citrus. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases, 1, 23-30.

Suenaga O. 1969. Age grouping method by ovariole changes following oviposition in female of *Musca domestica vicina*, and its application to field populations. Trop. Med. 11: 76-90.

Sukontason K., Sukontason K.L., Piangjai S., Boonchu N., Kurahashi H., Hope M., Olson J.K. 2004. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. Micron 35: 391-395.

Sukontason K.L., Bunchu N., Methanitikorn R., Chaiwong T., Kuntalue B., Sukontason K. 2006. Ultrastructure of adhesive device in fly in families calliphoridae, muscidae and sarcophagidae, and their implication as mechanical carriers of pathogens. Parasitol. Res. 98: 477-81.

Sukontason K.L., Bunchoo M., Khantawa B., Piangjai S., Rongsriyam Y., Sukontason K. 2007. Comparison between *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 38: 38-44.

Sun X., Barret B.A. 1999. Fecundity and fertility changes in adult codling moth (Lepidoptera Tortricidae) exposed to surfaces treated with tebufenozide and methoxyfenozide. J. Econ. Entomol. 92: 1039-1046.

Süss L. 2004. Gli intrusi: manuale di entomologia urbana. Edizioni Informatore Agrario, Verona, Italia.

- Süss L., Locatelli D.P. 2001. I parassiti delle derrate. Riconoscimento e gestione delle infestazioni nelle industrie alimentari. Edagricole, Bologna, Italia.
- Świątek P. 1999. Formation of the karyosome in developing oocytes of weevils (Coleoptera, Curculionidae). *Tissue Cell* 31: 587-593.
- Taibi F., Smagghe G., Amrani L., Soltani-Mazouni N. 2003. Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 135: 257-267
- Tan S.W., Yap K.L., Lee H.L. 1997. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 34: 527-531.
- Teal P.E., Proveaux A.T. 2006. Identification of methyl farnesoate from in vitro culture of the retrocerebral complex of adult females of the moth, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) and its conversion to juvenile hormone III. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61: 98-105.
- Telfer W.H. 2009. Egg formation in lepidoptera. *J. Insect Sci.* 9: 1-21.
- Thaddeus K., Ronald K., Robert H., Gilman R., Cranfield S. 2001. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Micr. Infect.* 3: 231-235.
- Thomas G., Jespersen J.B. 1994. Non-biting Muscidae and control methods. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13: 1159-1173.
- Thomsen E. 1940. Relation between corpus allatum and ovaries in adult flies (Muscidae). *Nature* 145: 28-29.
- Thomsen E. 1942. An experimental and anatomical study of the corpus allatum in the blowfly *Calliphora erythrocephala* Meig. *Vidensk. Medd. Dansk. Naturh. Foren. Kbh.* 106: 319-340.
- Thomsen M. 1951. Weismann's ring and related organs in larvae of Diptera. *Kongl. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Skr. Kbh.* 6: 1-32.
- Tine-Djebbar F., Larhem A.B., Soltani N. 2011. Enzyme immunoassay measurements of the molting hormone in different post-embryonic stages of two mosquito species, *Culex pipiens* and *Culiseta longiareolata*. *Afr. J. Biotech.* 10: 15195-15199.
- Tine-Djebbar F., Rehim N., Soltani N. 2012. Enzyme immunoassay measurements of ecdysteroids in the last larval stage of *Culex pipiens* L. (Diptera, Culicidae): Hormonal profile and correlation with cuticle secretion. *Afr. J. Biotechnol.* 11: 4693-4698.

- Tremblay E. 1982. Entomologia applicata. Vol. I: Generalità e mezzi di controllo. Liguori Editore, Napoli, Italia.
- Tremblay E. 1997. Entomologia applicata. Vol. III: Ditteri Brachiceri (Caliptrati), Sifonatteri e Strepsitteri. Liguori Editore, Napoli, Italia.
- Trepte H-H. 1979. Rate of follicle growth, change in follicle volume and stages of macromolecular synthesis during ovarian development in *Musca domestica*. J. Insect. Physiol. 25: 199-203.
- Trepte H.H., Trepte-Feuerborn C. 1980. Development and physiology of follicular atresia during ovarian growth in the house fly, *Musca domestica*. J. Insect Physiol. 26: 329-338.
- Turner E.C., Carter L. 1990. Mass rearing and introduction of *Ophyra aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae) in high-rise caged layer houses to reduce house fly populations. J. Agric. Entomol. 7: 247-257.
- Ucan M.C., Erol B., Balacan F., Atilgan S., Yaman F., Arslanoglu Z., Agacayak S.K., Guven S., Gunay A. 2011. Myiasis caused by *Musca domestica* larvae in a child: a case study. J. Anim. Vet. Adv. 10: 2149-2152.
- Valder S.M. 1969. Reproductive system morphology of the face fly, *Musca autumnalis*, with notes on a gynandromorphy. J. Kans. Entomol. Soc. 42: 176-182.
- Van Geem T., Broce A.B., Moon R.D. 1983. A system for physiological age-grading of female face flies *Musca autumnalis* De Geer. Bulletin - Kansas Agricultural Experiment Station 643: 1-23.
- Velentzas A.D., Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I.S. 2007. Stage-specific regulation of programmed cell death during oogenesis of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) Int. J. Dev. Biol. 51: 57-66.
- Wells M.J. 1954. The thoracic glands of Hemiptera Heteroptera. Q. J. Microsc. Sci. 95: 231-244.
- Wicker C., Jallon J.M. 1995. Influence of ovary ecdysteroids on pheromone biosynthesis in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Eur. J. Entomol. 92: 197-202.
- Wicker-Thomas C. 2007. Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. J. Insect Physiol. 53: 1089-1100.
- Williams C.M. 1956. The juvenile hormone of insects. Nature 178: 212-213.

- Wolff H.L., van Zijl W.J. 1969. Houseflies, the availability of water, and diarrhoeal diseases. Bull. World Health Organ. 41: 952-959.
- Wyatt G.R. 1997. Juvenile hormone in insect reproduction – a paradox? Eur. J. Entomol. 94: 323-333.
- Xie T., Spradling A.C. 1998. *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. Cell 94: 251-260.
- Yin C.M, Zou B.X, Jiang M.G., Li M.F., Qin W.H., Potter T.L., Stoffolano J.G. 1995. Identification of juvenile hormone III bisepoxide (JHB3), juvenile hormone III and methyl farnesoate secreted by the corpus allatum of *Phormia regina* (Meigen), in vitro and function of JHB3 either applied alone or as a part of a juvenoid blend. J. Insect Physiol. 41: 473-479.
- Yu S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press Taylor and Francis Group, New York, USA.
- Yuan H., Chiang C.Y., Cheng J., Salzmann V., Yamashita Y.M. 2012. Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells. Dev. Biol. 361: 57-67.
- Zurek L., Schal C., Watson D.W. 2000. Diversity and contribution of the gastro-intestinal bacterial community to the development of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. J. Med. Entomol. 37: 924-928.